

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Adsorptionsverhalten von Everolimus in vitro und Auswirkungen auf die Zellkultur

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Susanne Schnürer
aus München
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Fischereider

Mitberichterstatter: Privatdozentin Dr. Kirsten Eibl-
Lindner

Privatdozent Dr. Markus
Rehberg

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard
Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2016

Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael Fischereder bedanken, der mir eine Doktorarbeit in meinem Wunschgebiet Nierentransplantation ermöglicht hat und mich stets mit seiner Begeisterung für wissenschaftliche Fragestellungen angesteckt hat.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Vogeser und seinen Mitarbeitern vom Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern, für die Messung der Everolimuskonzentrationen in meinen Proben bedanken. Ein Dank geht auch an Herrn Prof. Toni Lindl vom Institut für angewandte Zellkultur, Balanstr. 6, München für die Weichglas- Flaschen, die er unserer Arbeitsgruppe zu Versuchszwecken überlassen hat.

Zudem möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich bei den Labor-Versuchen anleiteten und tatkräftig unterstützten: Christina Dengler, Simon Gahr und Ulrike Belschner. Danke für eure Hilfe und Freundschaft.

Zuletzt ein Dankeschön an meine Eltern, ohne deren Liebe zu den Naturwissenschaften und für die Medizin ich heute keine Ärztin wäre. Danke an C und die Seinen, die für mich zur zweiten Familie geworden sind.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Entdeckung und Anwendungsbereiche von Rapamycin	1
1.2.	mTOR- pathway	2
1.3.	Vorversuche	9
1.4.	Fragestellung.....	11
2.	Material.....	12
2.1.	Reagenzien, Medien, Puffer, Antikörper	12
2.2.	Zelllinien	15
2.3.	Verbrauchsmaterial	15
2.4.	ELISA- Kits	18
2.5.	Geräte	19
3.	Methoden	21
3.1.	Zellkultur.....	21
3.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	22
3.3.	Western Blot.....	23
3.4.	Bestimmung der Everolimuskonzentration mittels LC-MS/MS	25
3.5.	Abhängigkeit der Everolimuslöslichkeit von der Proteinkonzentration.....	25
3.6.	Adsorption von Everolimus	26
3.7.	ELISA	28
4.	Ergebnisse	30
4.1.	Everolimuslöslichkeit korreliert mit der Proteinkonzentration	30
4.3.	Zellversuche mit Adsorption	41
4.4.	p-p70s6K- Western Blot	55
4.5.	ELISA bei HUVEC	59
5.	Diskussion	63
5.1.	Everolimuslöslichkeit korreliert mit der Proteinkonzentration	63
5.2.	Adsorption an Oberflächen	63
5.3.	Zellversuche mit Adsorption	64
5.4.	Die Expression der p-p70s6K	65
5.5.	Die Expression von VEGF in HUVEC	66
5.6.	Ausblick	67
6.	Zusammenfassung	69
7.	Abkürzungen	71
8.	Appendix- Gele gießen	73
9.	Literaturverzeichnis.....	75
10.	Eidesstattliche Versicherung	84

1. Einleitung

1.1. Entdeckung und Anwendungsbereiche von Rapamycin

Erstmals isoliert wurde Rapamycin im Jahre 1965 aus dem Bakterienstamm *Streptomyces hygroscopicus*, gewonnen aus einer Bodenprobe von der Osterinsel Rapa-Nui [1]. In den nächsten Jahren konnte eine antimikrobielle Wirkung identifiziert werden, am stärksten ausgeprägt gegen die Hefe *Candida albicans*, weniger stark gegen einige Dermatophyten und wenige grampositive Bakterien [2]. Aufgrund dessen erhielt die Substanz den Namen RAPA [Rapa Nui] – Mycin [3]. Lange Zeit war die chemische Struktur unbekannt, bis sie 1978 durch Swindell et. al. mittels Crystallographie entschlüsselt wurde: es handelte sich bei der Substanz um ein Makrolidantibiotikum mit der Strukturformel $C_{51}H_{79}NO_{13}$ [4].

Die immunsuppressive Wirkung der Substanz wurde etwa zeitgleich entdeckt, als Martel et. al. an Ratten zeigen konnten, dass Rapamycin die Entwicklung von allergischer Enzephalomyelitis und adjuvanter Arthritis sowie die Bildung von Ig-E Antikörpern verhinderte [5]. Zudem besitzt Everolimus eine strukturelle Ähnlichkeit zu Tacrolimus oder FK506, dessen immunsuppressive Wirkung bereits 1987 durch Kino et al. in vitro gezeigt werden konnte [6, 7]. Die Wirksamkeit bei Organtransplantationen bestätigte sich sowohl am Mausmodell als auch in klinischen Studien [8, 9], sodass es schließlich im Jahre 1999 offiziell in der Nierentransplantation eingeführt wurde [10]. Es findet zudem immer mehr Eingang in die Immunsuppression nach der Transplantation anderer Organe, zum Beispiel des Herzens [11].

Früh eröffnete sich ein weiteres Einsatzgebiet von Rapamycin: die antiproliferative Therapie bei verschiedenen Tumoren. Eng et al. zeigten 1984 an Mäusen mit hohem Risiko für Kolonkarzinome einen protektiven Effekt von Rapamycin in Kombination mit 5-Fluoruracil und Cyclophosphamid im Vergleich zur Kombination 5-Fluoruracil – Adriamycin – Cyclophosphamid [12]. Mehrere Studien konnten zudem den positiven Effekt des Rapamycin-Esters Temsirolimus (CCI-779) bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom mittels Angiogenesehemmung verdeutlichen [13, 14]. So wurden die Rapamycin-Derivate CCI-779 (Torisel) und RAD001 (Afinitor) in den Jahren 2007 und 2009 zu dessen Therapie zugelassen [1]. Darüber hinaus gibt es Hinweise über die Wirksamkeit der Substanzklasse auch beim fortgeschrittenen Mammakarzinoms und

neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes [15, 16]. Weitere Untersuchungen zu anderen Tumorentitäten laufen.

Neuestes Einsatzgebiet von Sirolimus ist die Beschichtung von Koronarstents zur Prävention von Re-Stenosen bei Koronarer Herzkrankheit. Dazu wird ein Gerüst aus verschiedenen Metallkombinationen (zum Beispiel Kobalt- Chrom, Platin- Chrom, Kobalt- Nickel) mit einem nicht-erosionsanfälligen Fibrin-Polymer beschichtet, das das Medikament – in diesem Fall Everolimus – enthält. Wahlweise kann auch zuerst das Fibrinpolymer aufgebracht werden, das anschließend von einer Schicht der therapeutischen Substanz bedeckt wird. Danach wird der Stent mit einer zweiten Schicht aus Fibrinpolymer mit wenig oder keinerlei therapeutischer Substanz überzogen. Auf diese Weise ist das Medikament während der Expansion des Stents in eine flexible Grundsubstanz eingebettet, deren Freisetzung nach Stent-Implantation zusätzlich verzögert wird.

Die Herstellung eines Drug-Eluting-Stents gestaltet sich sehr einfach: das Metallgerüst (oder auch Polymergerüst) wird direkt in die Lösung getaucht oder der Wirkstoff wird aufgesprüht. Die Menge des enthaltenen Medikaments kann durch die Konzentration der Substanz innerhalb der Schichten oder der Auswahl des Polymers angepasst werden (vergleiche [17-20]).

Die Vorteile von DES und speziell des EES konnten bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden: im Vergleich zum Bare-Metal-Stent (BMS) traten in der EXAMINATION Studie 2008 – 2010 beim Everolimus-Eluting-Stent (EES) signifikant weniger In-Stent-Thrombosen auf und es mussten weniger Revaskularisationen der bereits gestenteten Läsionen durchgeführt werden [21]. Aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Vergleich von Rapamun-beschichteten mit anderen DES [22].

1.2. mTOR- pathway

1.2.1. TOR

mTOR ist die Kurzform für mammalian Target of Rapamycin, also Zielsubstanz von Rapamycin beim Säugetier. Die Erforschung des (m)TOR-pathways erfolgte initial vor allem an *Saccharomyces cerevisiae* (Backhefe), obwohl TOR1 und TOR2 als voneinander getrennte Gene nur bei sehr wenigen Eukaryonten existieren. So konnte

der mTOR-pathway vergleichsweise einfach untersucht werden [1]. Die folgenden Ausführungen beziehen sich deshalb auf die Forschungsergebnisse bei Hefen.

1.2.2. FKBP12, TOR1 und TOR2

Rapamycin bindet in vitro an die Prolyl- Isomerase FKBP12. Der Name des Enzyms leitet sich von einer anderen Substanz ab, zu der es Affinität zeigt: Tacrolimus – FK506 (FK506 binding protein 12) [23]. Der Rapamycin- FKBP12- Komplex wiederum bindet an die beiden Untereinheiten von TOR -TOR1 und 2- im Bereich der FKBP12-Rapamycin-bindenden Domäne (FRB) [10]. Die genaue Bedeutung der FRB in vivo ist noch unklar, auch wenn erste Studien zeigen konnten, dass das Einbringen von FRB in Osteosarkomzellen den Ablauf der Zellvermehrung empfindlich stört [24]. Zudem ist bei Mäusen mit genetischem FKBP12-Mangel die mTOR- und p70s6K- Phosphorylierung erhöht [23].

Entgegen aller Erwartungen zeigte sich jedoch an Hefen, dass FKBP12 nicht relevant für das Zellwachstum ist [25], es handelt sich hierbei also nur um einen Cofaktor oder Rezeptor von Rapamycin, keinen eigenständigen Wachstumsfaktor [1].

Erste Hinweise auf ein Zielprotein des Rapamycin-FKBP12-Komplexes gab es 1993, als Cafferkey et al. genetische Analysen und Rapamycinversuche an Hefen durchführten. Damals erhielten die beiden Untereinheiten des Zielproteins den Namen DRR 1 und 2 („dominant Rapaymcin-resistance“) [26].

Später konnten die Proteine genauer klassifiziert werden: es handelt sich bei TOR1 und TOR2 um 281-kDa- bzw. 282-kDa-große Phosphatidyl-Inositol-Kinasen (PIK) mit 67-prozentiger genetischer Übereinstimmung. Zudem scheint TOR1 nicht essentiell für die Zellteilung, ein TOR1- und TOR2-Knockout jedoch führt zum Stillstand des Zellzyklus. Ein Knockout von TOR2 wirkt letal, ohne den Zellzyklus zu unterbrechen [27].

Diese Ergebnisse führten zur Annahme, dass vor allem TOR2 relevant für das Zellwachstum ist. Es musste jedoch noch ein pathway existieren, in dem TOR1 und TOR2 beide eine Rolle spielten (vergleiche [1]).

1.2.3. TORC1 und TORC2

Ein weiterer Schritt in der Erforschung des mTOR-pathways war die Entdeckung, dass TOR1 und TOR2 in vivo zusätzlich in Proteinkomplexen organisiert sind, TOR Complex 1 und 2 (TORC1 und TORC2). TORC1 besteht neben TOR1 oder TOR2 aus den Proteinen KOG1 (YHR186C) und LST8. TORC2 besteht aus TOR2, AVO1 (YOL078w),

AVO2 (YMR068w), AVO3 (YER093c) und LST8. Nur TORC1 kann Rapamycin binden (vergleiche [28]), folglich ist es am gemeinsamen TOR1-TOR2-pathway beteiligt [1].

Im Gegensatz zum Signalweg, welcher TORC1 beinhaltet, ist über jenen mit TORC2 wenig bekannt.

Ebenso wie der TORC1- pathway scheint er für Zellwachstum verantwortlich zu sein. Mäuseembryonen, denen das Gen für einen essentiellen Teil von TORC2 – Rictor – fehlt, entwickeln sich zunächst normal, erleben dann jedoch einen Wachstumsstopp und versterben noch vor der Geburt [29]. Auch aus diesem Grund ist es besonders schwierig, den TORC2-pathway näher zu erforschen [30]. Gezeigt werden konnte bisher unter anderem, dass der Komplex bei der Entwicklung des Zytoskeletts eine Rolle spielt [31]. Zudem aktiviert er zusammen mit seinem Bindungspartner Rictor Akt mittels Phosphorylierung [32].

Chromatographien lassen vermuten, dass es sich bei TORC1 um einen dimeren Komplex handelt [1], was eine Übereinstimmung zur Struktur des Säugetier-TORC1 (mTORC1) nahelegt [33]. Der Komplex wird durch mehrere unabhängige Faktoren und Signale aktiviert und beeinflusst selbst viele pathways. Eine Übersicht soll folgende Abbildung liefern.

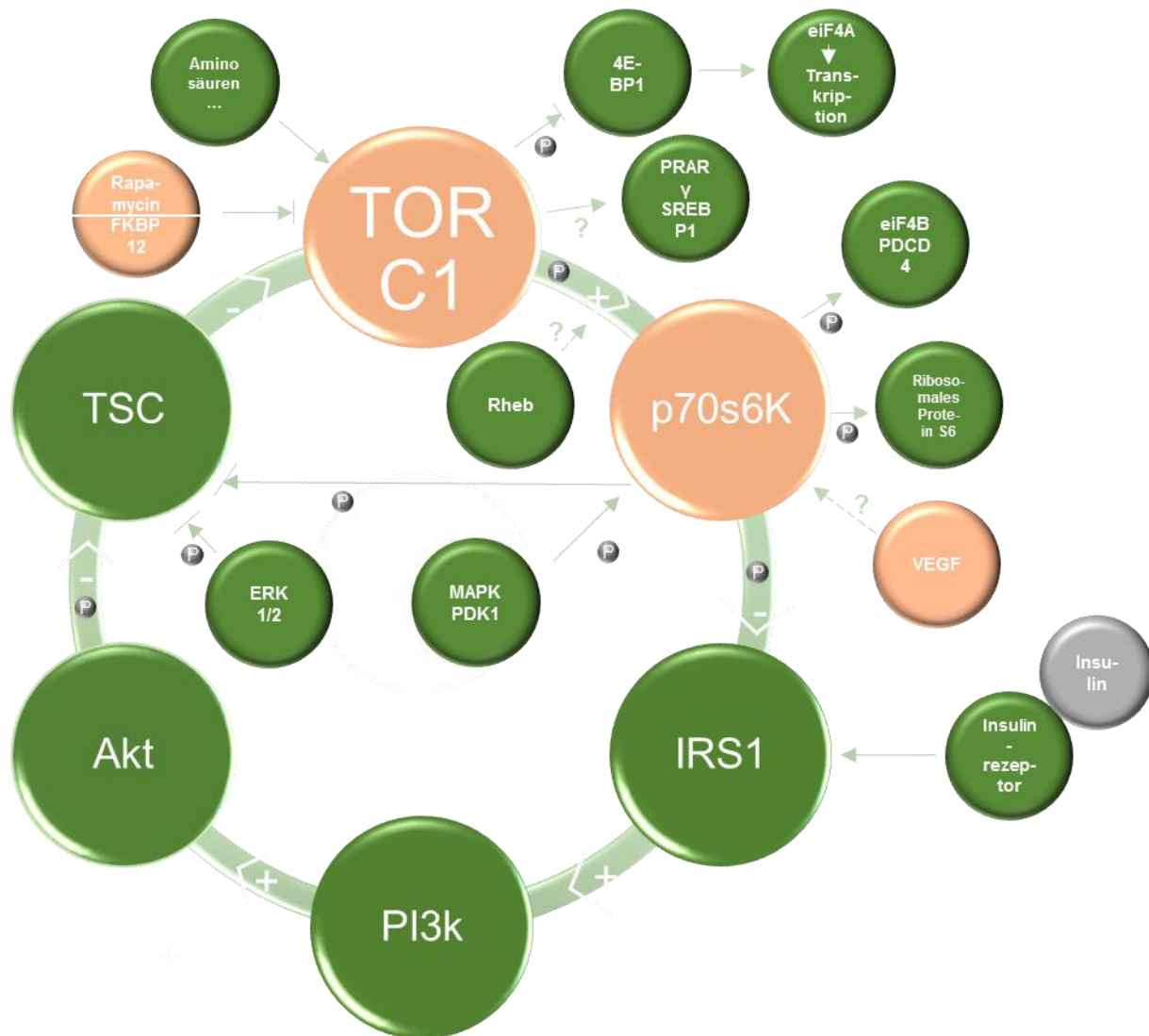


Abbildung 1: TORC1-pathway.

1.2.3.1. Upstream von TORC1

Zwingend benötigt TORC1 die Bindung mit der GTPase Rheb für seine Aktivierung [34], der genaue Mechanismus ist unbekannt.

TORC1 selbst wird in vivo von dem Tuberous Sclerosis Complex (TSC, bestehend aus TSC1 [Hamartin] und TSC2 [Tuberin]) gehemmt. Kommt es über die Phosphorylierung von TSC2 durch die Kinase Akt [35] zu einer Destabilisierung und damit Inaktivierung des gesamten TSC-Komplexes, wird TORC1 konsekutiv aktiviert. Ausgelöst wird die vermehrte Expression der Akt unter anderem durch Bindung von Insulin an dessen zellständigen Rezeptor, vermehrte Freisetzung von IRS1 und PI3K-Hochregulierung

[36]. Die Phosphorylierung von TSC2 ist auch durch ERK1/2 [37] oder über eine negative Rückkopplung durch p70s6K (siehe Kapitel 1.2.7., [38]) möglich. Verstärkt werden derartige Prozesse durch Faktoren wie TNF α [39] und Wnt [35] (vergleiche [30]).

Die Regulierung der TORC1- Aktivität findet gleichermaßen auf der Ebene von Umweltfaktoren statt. So konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Aminosäuren [40] und möglicherweise Phosphorsäure [41] TORC1 stimuliert, wohingegen beispielsweise Koffein [42], der Mangel an Kohlenstoff und Stickstoff [43] beziehungsweise Sauerstoff [44] negative Effekte zu haben scheinen. Auch niedrige Konzentrationen an zellulären Energieäquivalenten wie ATP hemmen den Komplex [45]. Dies deutet darauf hin, dass die TOR-Kinasen sensible Organe zur Überprüfung der Lebens- und Wachstumsbedingungen einer Zelle darstellen.

Selbstverständlich existieren auch genetisch determinierte Hemmproteine für die Aktivierung von TOR, dazu zählt unter anderem das Tumorsuppressorprotein p53 [46].

1.2.3.2. Downstream von TORC1

Die Aktivierung der Translation von Genen und damit der Zellsynthese wird unter anderem durch die Phosphorylierung von 4E-BP1 durch TORC1 initiiert [47, 48]. Durch die chemische Veränderung des Proteins geht dessen natürliche Bindung an den Proteinkomplex eIF4A verloren, wodurch es wiederum an cap-mRNA-Transkripte und Untereinheiten des Translations-Initiationskomplexes binden kann. Die cap-abhängige Translation und anschließende Transkription stellen Proteine der Zellproliferation und des Zellwachstums her (vergleiche [49]).

TORC1 beeinflusst überdies den oxidativen Zellstoffwechsel innerhalb der Mitochondrien, indem es - direkt und indirekt – mitochondriale Biogenese und Energieumsatz steigert [50, 51].

Downstream gelegen von TOR sind ferner die Transkriptionsfaktoren PRAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ) [52] und SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1) [53], die Glukose- und Fettstoffwechsel regulieren [54].

1.2.4. Die p70s6-Kinase

1.2.4.1. *Aktivierung und Substrate der Kinase*

Neben 4E-BP1 und PRARy reguliert TORC1 noch ein weiteres Protein: p70s6K und dessen Isoform p85s6K [55, 56]. Da auf diese Kinase ein Hauptaugenmerk in dieser Doktorarbeit gerichtet ist, erhält sie im Gegensatz zu den anderen Phosphorylierungsprodukten von TORC1 ein eigenes Kapitel.

Ein Hinweis für die Phosphorylierung von p70s6K durch TORC1 ist die Tatsache, dass bei mTOR-Mutanten, die den FKBP12-Rapamycin-Komplex nicht binden können, p70s6K exorbitant erhöht ist [57].

Zusätzlich wird die p70s6-Kinase direkt oder indirekt von der MAP-Kinase [58], von PDK1 [59] und von PI3K [60] aktiviert, die Relevanz dieser Tatsache zeigte sich in vivo jedoch als irrelevant (erstes [61]) beziehungsweise unklar (letzte [61-63]) bezüglich des Fortschreitens des pathways.

mRNA-Transkripte für die Translation von ribosomalen Proteinen und teilweise von Elongationsfaktoren enthalten ein sehr spezielles Top an ihrem 5'-Terminus: ein ungewöhnliches Oligopyrimidin [64, 65]. Die sogenannte 5'TOP-mRNA macht ca. 20% der gesamten mRNA-Masse intrazellulär aus [65]. Die Existenz der 5'TOP-mRNA wiederum ist scheinbar abhängig von der Phosphorylierung der p70s6Kinase, da die Zugabe von Rapamycin eine Abnahme der Transkripte bedingt [66].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Übertritt der Zelle in die Synthesephase bei Rattenembryonen durch Zugabe von p70s6K-Antikörpern verhindert werden kann [67]. Möglicherweise hängt dies mit den bereits identifizierten Phosphorylierungsprodukten der p70s6K zusammen: unter anderem das Tumorsuppressorprotein PDCD4 und eIF4B (vergleiche [49]) sowie das ribosomale Protein S6 [55, 68]. Überdies wird IRS1 von p70s6K phosphoryliert und damit wiederum destabilisiert [36], was einem negativen Feedbackmechanismus gleichkommt.

Also kann davon ausgegangen werden, dass die p70s6-Kinase eine Rolle bei der Proteinbiosynthese der ribosomalen Proteine und somit der Zellteilung spielt. Unterstützt wird diese These von der Tatsache, dass Fruchtfliegen vom Typ *Drosophila melanogaster* mit genetisch bedingtem Mangel an p70s6K signifikante Wachstumsverzögerung und vermindertes Körpergewicht zeigen [69]. Auch p70s6K-Knockout-Mäuse sind, vor allem innerhalb der embryologischen Entwicklung, kleiner als vergleichbare Individuen ohne genetischen Mangel. Zudem leiden sie unter Glukoseintoleranz aufgrund Hypoinsulinismus [70].

1.2.4.2. Die Kinase als Biomarker

Es gibt verschiedene Studien, die nahelegen, dass die p70s6-Kinase als Phosphorylierungsprodukt von mTORC1 als Biomarker für die Rapamycinwirkung in vivo herangezogen werden kann.

So konnte durch Peralba et al. 2003 an einem kleinen Patientenkollektiv mit Nierenzellkarzinom gezeigt werden, dass bei Anwendung des Rapamycinderivates CCI-779 (Temsirolimus) die Phosphorylierung der p70s6-Kinase in PBMC-Zellen (peripheral blood mononuclear cells) negativ mit der Zeit zum Tumorprogress korrelierte. Gemessen wurde die Phosphorylierung nach Antikörperinkubation sowohl mittels Densitometrie anhand von Röntgenaufnahmen der getrockneten Gele als auch mittels Szintillationszähler anhand von Phosphozellulosepapier, auf das jeweils eine kleine Probenmenge aufgebracht worden war. An Mäusen hatte die Arbeitsgruppe zuvor gezeigt, dass das Maß der p70s6K-Aktivität in PBMC dem der Tumorzellen entsprach [71]. Auch Boulay et al. beobachteten 2004 an Ratten mit genetisch bedingtem Pankreastumor vergleichbares und schlugen p70s6K als Biomonitor bei der Rapamycintherapie vor [72].

Tabernero et al. demonstrierten 2008 in einer Studie mit 55 Patienten mit verschiedenen fortgeschrittenen soliden Tumoren, dass die Everolimusdosis direkt mit der Expression von p70s6K und 4E-BP1 in Tumor und Hautbiopsie zusammenhing. Zudem wurde bei den Patienten eine um 50% erhöhte Akt-Aktivität gemessen. [73]

Die Phosphorylierung der p70s6K scheint jedoch keinem Alles-oder-nicht-Prinzip zu unterliegen.

Durch Hartmann et al. wurde 2008 dokumentiert, dass bei einem Patientenkollektiv nach Nierentransplantation unter Sirolimustherapie unterhalb einer Marke von 6 ng/ml Blutsirolimuskonzentration die Phosphorylierung der p70s6-Kinase im Western Blot bei den verschiedenen Individuen sehr unterschiedlich ausgeprägt war. Gleichzeitig war die Aktivität der p70s6-Kinase bei gesunden Individuen stets ähnlich groß. Patienten innerhalb des Kollektivs, die eine Organabstoßung erlitten, hatten durchgehend hohe p-p70s6K-Konzentrationen, im Gegensatz zu Patienten ohne Abstoßung. Man ging sogar soweit, die Phosphorylierung der p70s6K als Prädiktor für Abstoßung zu benennen (vergleiche [74]).

1.2.5. VEGF und TOR

Bei VEGF (Vascular endothelial growth factor) handelt es sich um einen Wachstumsfaktor für Vascular endothelial cells [75]. Seine tragende Rolle bei der Angiogenese in vivo konnte unter anderem von Shweiki et al. demonstriert werden, die Untersuchungen an tragenden Mäusen durchführten. Hier ließ sich VEGF vor allem bei intrauterinen und – ovariellen Prozessen nachweisen, die die Bildung neuer Gefäße erforderten [76]. Auch Jakeman et al. maßen erhöhte VEGF-Konzentration bei Rattenembryos vor allem in der Postimplantationsphase, die die Sprossung von Gefäßen voraussetzt [77].

Dem gegenüber stehen Versuche, die nahelegen, dass die Hemmung von VEGF Prozesse verlangsamt, die eine hohe Rate an Gefäßvermehrung benötigen: Tumore.

Kim et al. konnten an Mäusen zeigen, dass die Gefäßbildung und somit das Wachstum in implantierten soliden Tumoren stark zurückging, sobald ein Anti-VEGF-Antikörper gegeben wurde [78]. Heute haben Anti-VEGF-Antikörper längst Einzug in die Klinik gehalten: Bevacizumab findet bei Tumoren wie dem Kolon-, dem Rektum- und dem Nierenzellkarzinom, dem Mamma- und dem Ovarial- sowie dem Bronchialkarzinom seine Anwendung [79], Ranibizumab soll die Gefäßneubildung bei altersbedingter Makuladegeneration vermindern (vergleiche [80]).

Über welchen Signalweg aber wirkt VEGF auf die Zellen?

Ein Zusammenhang von VEGF mit dem mTOR-pathway konnte 2009 durch Trinh et al. verdeutlicht werden: war VEGF aktiviert, wurde auch ein downstream von TORC1 gelegenes Protein - ribosomales Protein 6 – vermehrt phosphoryliert [81]. Ähnliches zeigten auch Ruhul et al.: in menschlichen Endothelzellen wurde die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Box-Familie (FOX) über den PI3K/Akt-Signalweg mittels VEGF ausgelöst [82].

1.3. Vorversuche

Das Ergebnis der letzten hier genannten Studie lassen vermuten, dass verschiedene Individuen (interindividuell) und innerhalb des Individuums dessen verschiedenen Zellen (intraindividuell) unterschiedliche Ausprägungen der p70s6-Kinase zeigen. Diese Theorie war Anlass zum Entwurf meines ursprünglichen Doktorarbeitsthemas: intra- und interindividuelle Phosphorylierung der p70s6-Kinase.

Einleitung

Mehrere Vorversuche mit Fibroblastenzellen 293T wurden durchgeführt, in denen die wachstumshemmende Wirkung von Rapamycin in Medium gezeigt werden sollte. Das Zellwachstum war bei gleichen Konzentration des Medikaments jedoch nicht stabil. So waren die Zellvermehrungsraten innerhalb der einzelnen Gruppen zu inhomogen und Gruppen mit höheren Rapamycinkonzentrationen vermehrten sich teilweise besser als jene mit geringeren Konzentration oder ohne Rapamycin.

Nachmessungen der Rapamycinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen in definierten Zeitabständen vom Ansetzen ergaben meist Messwerte unter der Nachweisgrenze.

1.4. Fragestellung

Zusammen mit der Tatsache, dass die Beschichtung von Koronarstents mit Rapamycin einen vergleichsweise unproblematischen Vorgang darstellt (siehe Punkt 1.1.), stellte sich uns folgende Frage: adsorbierte Rapamycin an die Oberflächen der Zellkulturflaschen?

Kombiniert mit dem Zerfall durch UV-Licht könnte das die Ursache für die reduzierte Konzentration in den Lösungen sein.

Das vorrangige Ziel unserer Untersuchungen war nun, herauszufinden, ob Rapamycin – oder sein hier ausgewähltes Derivat Everolimus – durch die Oberflächen der Zellkulturflaschen aufgenommen wurde, ob es einen Unterschied zwischen dem Adsorptionsverhalten verschiedener gängiger Zellkulturflaschen gab und welche anderen Faktoren die Everolimuskonzentration in Lösung beeinflussen.

Außerdem sollte untersucht werden, ob diese Adsorption relevant für das Zellwachstum und die Aktivität von mTOR, seinem Phosphorylierungsprodukt p-p70s6K sowie VEGF war.

2. Material

2.1. Reagenzien, Medien, Puffer, Antikörper

2.1.1. Reagenzien

Produktname	Lieferant	Produktnummer
2-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)	4227.3
2-Propanol 70%	Carl Roth (Karlsruhe)	CN09
30% Acrylamide mix (4-8°C)	Carl Roth (Karlsruhe)	
Albumin Fraktion V (4°C)	Carl Roth (Karlsruhe)	8076.4
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma (Taufkirchen)	A3678
Aqua destillata und bidest	Carl Roth (Karlsruhe)	
Bradford Reagent	Sigma (Taufkirchen)	B 6916
Bromphenolblau, fest	Carl Roth (Karlsruhe)	A512.1
BSA- Bovine Serum Albumin, biotinfrei	Carl Roth (Karlsruhe)	0163.2
CEA-RP – new 18x24	Ernst Christiansen GmbH	
Coumaric acid (Parahydroxycumarinsäure)	Sigma (Taufkirchen)	C9008
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Sigma (Taufkirchen)	472301
Everolimus	Sequoia Research Products (Pangbourne, UK)	SRP02750e
Gelatine	Merck	1.04070
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)	3783.1
H ₂ O ₂ (4°C)	Sigma (Taufkirchen)	H-0904
Methanol	Merck	1.06008
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)	T145.2
N ₂ (flüssig)		
Natriumazid	Carl Roth (Karlsruhe)	K305.1
PMSF (Phenylmethylsulfonyl- fluorid)	Carl Roth (Karlsruhe)	6367

Material

Produktname	Lieferant	Produktnummer
Ponceau S Solution for electrophoresis, hier als Ponceau- Rot bezeichnet	Serva Electrophoresis	33427
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)	P2714
Proteinstandard "Ladder" See Blue prestained, 500µl	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)	LC 5925
Roti®-Quant (50ml)	Carl Roth (Karlsruhe)	K015.2
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Carl Roth (Karlsruhe)	1057.1
SuperSignal® ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific (Hennigsdorf)	37075
TEMED (N-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamine)	Carl Roth (Karlsruhe)	2367
Tryphanblau		
TrypLE Express Stable Trypsin Replacement Enzyme without Phenol Re	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)	12604039
Tween 20	Serva	37470

2.1.2. Medien und Puffer

Produktname	Lieferant	Produktnummer
1,5M Tris-HCl (pH 6,8, 4°C), 5l =pH 6,2 bei RT	Apotheke Innenstadt Uni München Pettenkoferstr. 8a, 80336 München	T20
1,5M Tris-HCl (pH 8,8, 4°C), 5l =pH 8,2 bei RT	Apotheke Innenstadt Uni München Pettenkoferstr. 8a, 80336 München	T21
Cell Extraction Buffer	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)	FNN0011
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) low glucose, pyruvate	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)	

Material

Produktname	Lieferant	Produktnummer
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), ohne Calcium, ohne Magnesium	PAN Biotech (Aidenbach)	
Elektrophorese-Puffer 10x Konz., 5 l	Apotheke Innenstadt Uni München Pettenkoferstr. 8a, 80336 München	T18
Endothelial Cell Growth Kit-VEGF	ATCC	PCS-100-041
FCS (fetal calf serum)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)	10270106
Gel-Transfer-Puffer, Tris 250 mM, 5l	Apotheke Innenstadt Uni München Pettenkoferstr. 8a, 80336 München	T0047-5
TBS 10x, pH= 8,0, 5l	Apotheke Innenstadt Uni München Pettenkoferstr. 8a, 80336 München	T03290
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth (Karlsruhe)	
Vascular Cell Basal Medium	ATCC	PCS-100-030

2.1.3. Antikörper

Produktname	Lieferant	Produktnummer
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology (Boston, USA)	7076
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology (Boston, USA)	7074
β - Actin (9), mouse anti human	Santa Cruz biotechnology (Heidelberg)	sc-130301
Phospho- p70S6- Kinase (THR389) Antibody, rabbit anti	Cell Signaling Technology (Boston, USA)	9205

Material

Produktname	Lieferant	Produktnummer
mouse		

2.2. Zelllinien

Name, Ursprung	Lieferant	Produktnummer
293T	DSMZ (Braunschweig)	ACC 635
VSMC	Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Guba, Klinikum Großhadern	
HUVEC	ATCC	PCS-100-013

2.3. Verbrauchsmaterial

2.3.1. Allgemein

Produktname	Lieferant	Produktnummer
BD Falcon Polypropylene conical Tubes, hier als Falcon Röhrchen bezeichnet	BD (Heidelberg)	3500159
Eppendorf tubes in den Größen 0,5 , 1, 1,5, 2 ml	Eppendorf (Hamburg)	
Filterpapier (normal und extra thick blot paper)	BioRad (München)	1703966/A
Folie, Frischhaltefolie 30x30x500	Wirtschaftslager, Klinikum Großhadern, München	3100241
Hämacytometer		
Kryoröhrchen, steril, 1,8 ml	Nunc (Langenselbold)	KY02
Medical X-Ray Screen Film blue sensitive	CEA (Hamburg)	

Produktname	Lieferant	Produktnummer
Multiwell Platten mit 96 wells, transparenter Boden, unbeschichtet	Nunc (Langenselbold)	265302
Pinzette mit flachen Enden		
Pipettenspitzen in den Größen 0,1 – 10 µl, 2 - 200 µl, 1- 10 ml	Eppendorf (Hamburg)	
PVDF - Membran (0,2 µm)	BioRad (München)	162-0177
Phaser 740 Transparency Film A4-Size	Tektronix (Beaverton)	Phaser 740 Transparency Film A4-Size
Stripetten in den Größen 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated (Tokyo)	4487, 4488, 4489
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP (Trasadingen)	

2.3.2. Zellkulturflaschen

Produktname	Eigenschaften	Lieferant	Produktnummer
Borosilikatglas- Petrischalen, Duroplan	autoklaviert, 10 cm Durchmesser und 2 cm Höhe	Duran (Wien)	9170148
Collagen 1	Collagen-beschichtet, kationisch, Oberfläche 75 cm ²	Thermo Scientific (Hennigsdorf)	132707
Nunclon	gamma sterilisiert, hydrophil, Oberfläche 75 cm ²	Thermo Scientific (Hennigsdorf)	156367
Poly- D- Lysin	Poly- D- Lysin- beschichtet, kationisch, Oberfläche 75 cm ²	Thermo Scientific (Hennigsdorf)	132704
Ultra- low- attachment	gamma sterilisiert,	Corning (Lowell)	3814

Material

Produktname	Eigenschaften	Lieferant	Produktnummer
	hydrophil, Oberfläche 75 cm ²		
Unbeschichtet (easy flask non-treated)	gamma sterilisiert, leicht hydrophob, Oberfläche 75 cm ²	Thermo Scientific (Hennigsdorf)	156800
Weichglas- Flaschen	autoklaviert, Oberfläche hochtemperatur- vergütet mit Ammoniumsulfat, Oberfläche ca. 75 cm ²	Geschenk von Herrn Prof. Dr. T. Lindl, Institut für angewandte Zellkultur, Balanstr. 6, 81669 München	

2.4. ELISA- Kits

Firma und Name	Inhalt	Produktnummer
ELISA Kit, p70-S6K von Invitro-gen Corp.	<ul style="list-style-type: none"> • p70-S6K [pT389]- Standard • Standard- Verdünnungspuffer • Antikörper-beschichtete Wells, 12x8 Well Strips • p70-S6K [pT389] Detection- Antikörper Anti-Rabbit IgG HRP (100-fach konzentriert) • Sample Treatment- Puffer • HRP- Verdünnung • Waschpufferkonzentrat (25-fach konzentriert) • Stabilisiertes Chromogen, Tetramethylbenzidin • Stop- Lösung • Plattenabdeckungen 	#KHO0581
Quantikine ELISA Kit, Human VEGF Immuno-assay, von R&D Systems, Inc.	<ul style="list-style-type: none"> • VEGF Microplatte • VEGF Standard • VEGF Conjugate • Assay- Verdünnung RD1W • Calibrator- Verdünnung RD5K • Calibrator- Verdünnung RD6U • Waschpuffer-Konzentrat • Farbreagenzen A und B • Stop- Lösung • Plate- Sealers 	DVE00

2.5. Geräte

Gerät	Firma	Gerätetyp
Bechergläser, diverse	Schott	
Brutschrank (37°C, 5% CO ₂)	Forma Scientific	Nr. 3164
Cryo-Einfriergerät	Schmidt Laborgeräte (Wien)	Mr. Frosty
Dampfsterilisator	<i>H + P</i> Labortechnik AG (Oberschleißheim)	Varioklav Typ 25
Dreh-Schüttler	Miltenyi Biotech GmbH (Gladbach)	MX001
Eismaschine	Ziegra	
Gel releaser	BioRad (München)	1653320
Kurzzeitmesser, diverse	Oregon Scientific (Neu- Isenburg)	
Laborflaschen mit Schraubverschluß, diverse	Schott	
Magnetrührer	IKA (Staufen)	Combimag Ret
Mikroskop	Carl Zeiss AG (Oberkochen)	AxioLab A1
Mikrotiterplattenphotometer	Molecular Devices (Biberach an der Riss)	Versa Max tunable microplate reader
Mini-Protean® 3 Cell	BioRad (München)	165-3301
Mini-Protean® Comb, 10-well, hier als 10er-Kamm bezeichnet	BioRad (München)	165-3354
Mini-Protean® Gel releasers	BioRad (München)	165-3320
Mini-Protean® 3 System Glas Plates, hier als Gelkammer bezeichnet	BioRad (München)	165-3308
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld Superior (Lauda- Königshofen)	Neubauer improved, Tiefe 0,100 mm, 0,0025 mm ²
Pipetten, diverse (von 0,1 µl bis 10 ml)	Eppendorf (Hamburg) und Gilson (Middleton)	
Pipettierhelfer	neoLab (Heidelberg)	8-5010

Material

Gerät	Firma	Gerätetyp
Power Supply Power Pac 300	BioRad (München)	
Röntgenentwicklungs- maschine Standort: Forschungslabor B, Klinikum Großhadern, München	AGFA (München)	SCOPIX LR520
Röntgenkassette	DuPont (Köln)	
Spülmaschine	Miele Professional (Abingdon)	Mielabor G7733
Sterile Werkbank	Thermo Scientific (Hennigsdorf)	HERAsafe
Trans Blot SD SemiDry Transfer Cell, hier als semi-dry- Blotchamber bezeichnet	BioRad (München)	
Trockenschrank	Heraeus Holding GmbH (Hanau)	
Waage	Sartorius AG (Göttingen)	Universal U6100S
Wasserbad 37°C	Julabo (Seelbach)	“Julabo 26”
Wirbelmischer	Bender & Hobein GmbH (Zürich)	Vortex Genie 2
Zählmaschine, total-clicker		
Zentrifugen	Heraeus Holding GmbH (Hanau)	Multifuge 1 S-R und 3 S-R

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Zellen kryokonservieren

Von der ausgewählten Zellkultur wurden ungefähr 4.000.000 Zellen gut in Lösung gebracht und die Suspension in ein Falcon Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation mit 300 G und dem Verwerfen des Überstandes wurde zweimal mit DPBS gewaschen. Dazu wurde das Zellpellet „aufgeratscht“, 5-10 ml DPBS zugegeben, auf dem Vortexmischer gemischt und wieder zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun mit folgender Lösung versetzt: 700 µl Kulturmedium (DMEM) + 200 µl FCS + 100 µl DMSO (entspricht einem Verhältnis 7:2:1). Die Lösung wurde in Kryoröhrchen aliquotiert, welche genau bis zum Eichstrich befüllt wurden, und die Kryoröhrchen innerhalb eines Cryo-Einfriergeräts in ein Gefriergerät mit einer Temperatur von -80° C gebracht. Nach 24 Stunden werden die Röhrchen in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196° C eingelagert (vergleiche [83]).

3.1.2. Zellen auftauen

Hierfür entnahm man die Zellen aus dem Stickstoffbehälter und gab sie für weniger als eine Minute in ein Wasserbad mit der Temperatur 37° C, bis die Flüssigkeit vollständig aufgetaut war. Zeitgleich wurde unter sterilen Bedingungen für die Zellkultur passendes Medium mit 20% FCS in einem Falcon Röhrchen vorbereitet, um die Zellen nach dem Tauen sofort in Lösung geben zu können. Anschließend wurde mit 300 G zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Zellpellet wurde „aufgeratscht“, mit einer beliebigen kleinen Menge Medium mit 20% FCS vermischt und in eine Zellkulturflasche mit 10 ml Medium mit 20% FCS gebracht.

Nach ein bis zwei Tagen wurde das Zellwachstum unter dem Mikroskop kontrolliert und ein Mediumwechsel vorgenommen, um verstorbene Zellen zu entfernen. Dazu wurde das Medium in der Zellkulturflasche verworfen, mit 10 ml DPBS gespült und neues Medium mit 10 % FCS eingebracht.

3.1.3. Zellen splitten

3.1.3.1. *Ablösen 293T*

Fibroblastenzellen 293T sind sogenannte semi-adhärente Zellen, die sich teilweise auf dem Boden der Zellkulturflaschen, teilweise in Lösung befinden. Sie können leicht durch Erschütterungen wie Klopfen gegen die Zellkulturflasche abgelöst werden, im Gegensatz zu adhärenenten Zelllinien benötigt man hier kein Trypsin. Weiteres Vorgehen siehe Punkt 3.1.3.3.

3.1.3.2. Ablösen VSMC und HUVEC

VSMC und HUVEC sind adhärenzte Zellen. Zum Ablösen verwarf man zunächst das Medium in der Kulturflasche und spülte Oberfläche mit circa 10 ml DPBS. Anschließend brachte man 5 – 10 ml Trypsin TrypLE auf. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, das Zellbindungen untereinander und zum Boden aufbricht. Es folgte eine Inkubationszeit von 5 Minuten im Brutschrank. Abschließend gab man die doppelte Menge an frischem Medium dazu, um die katalytische Aktivität des Trypsins zu unterbrechen.

3.1.3.3. Zellen passagieren

Nachdem man die Zellen abgelöst hatte, pipettierte man die Medium-Zell-Suspension in ein Falcon Röhrchen und zentrifugierte sie. Der Überstand wurde wiederum verworfen und eine definierte Menge an neuem Medium zugegeben. 20 µl der entstandenen Lösung wurden mit 20 µl Tryphanblau vermischt und in beide Seiten einer Neubauer-Zählkammer gegeben. Mithilfe einer total-clicker Zählmaschine wurden unter dem Mikroskop die Zellen in acht verschiedenen Großquadraten à 1 mm² gezählt und der Mittelwert berechnet. Die Menge an Medium mit der gewünschten Anzahl an Zellen wurde in eine neue Kulturflasche mit 10 – 20 ml frischem Medium mit FCS überführt und in den Brutschrank gelagert.

3.1.4. Zellen lysieren

Um zelluläre Proteine für Bradford-Assay, Western-Blot und ELISA gewinnen zu können, mussten die Zellen lysiert werden. Dazu werden die Zellen erst abgelöst und in der Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe Punkt 3.1.3.), danach wurde die Zellsuspension in ein Falcon Röhrchen überführt und 7 Minuten mit 300 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Das Zellpellett wurde mit folgender Lösung bedeckt:

x Milliliter Lysepuffer + $0,005 * x$ µl Protease Inhibitor Cocktail + $0,0034 * x$ µl PMSF

Bemessen an der Zellzahl und –größe wurde Lysepufferlösung zu den Zellen gegeben. Nun folgte ein 30 minütiger Zeitraum, in dem die Suspensionen auf Eis lagerten und zu Beginn und nach jeweils 10, 20 und 30 Minuten mit dem Vortexmischer gemischt wurden. Die Suspensionen wurden in Eppendorf Tubes mit der Größe 1 Milliliter überführt und erneut zentrifugiert. Zuletzt wurde nur der Überstand entnommen und bei – 20°C eingefroren.

3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehalts eines Zelllysates vor der Durchführung von Western- Blots oder ELISAs wurden die Lysate im Verhältnis 1:100 mit Aqua destillata vermischt. Zeitgleich

Methoden

wurde eine Standardverdünnungsreihe mit BSA angesetzt. Je zwei nebeneinander liegende Wells wurden mit 50 µl folgender Standards befüllt: 0 (entspricht Aqua destillata), 100, 66, 50, 33, 25 µg/ml. Danach wurden je 50 µl der verdünnten Proben in weitere Wells gegeben. Eine Roti-Quant-Verdünnung in Aqua destillata im Verhältnis 2:5,5 wurde vorbereitet und je 200 µl zu den vorgelegten Standards und Proben pipettiert. Im Computerprogramm Softmax Pro, hier Version 4.7.1., wurden die Namen der Proben und die Verdünnungen der Standards angegeben, bevor die Platte nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten in das Gerät gelegt und ausgelesen wurde (vergleiche [84]).

3.3. Western Blot

Um Proteine einer Zellprobe einzeln untersuchen zu können, benötigt man ein geeignetes Verfahren wie den Western Blot (Texte vergleiche [85-88] und laborinterne Vorschriften).

3.3.1. Gele gießen

Siehe Appendix.

3.3.2. Proteindenaturierung

Die Proteine wurden nun durch Zugabe von fünffach konzentriertem Ladepuffer (Herstellung: 387 µl Tris-HCL [pH = 6,8 bei 4° C]; 4,4 ml Glycerin; 4,9 ml SDS 20%; 354 µl β-Mercaptoethanol; 1 Krümel Bromphenolblau) im Verhältnis 4:1 (Probe: Ladepuffer) denaturiert. Dazu wurden die Lösungen vermischt und der Puffer durch vierminütiges Erhitzen im Heizblock bei 95° C aktiviert. Jene 10-60 µl Probe, die auf das Gel aufgetragen wurden, sollten optimaler Weise 40 µg Protein enthalten [89].

3.3.3. Gel- Elektrophorese

Die Gelkammern wurden in die Elektrophoresekammer eingesteckt und die Kammer mit Elektrophoresepuffer in Aqua destillata (1:10) aufgefüllt. Die 10er-Kämme wurden vorsichtig aus den Gelen gezogen, in die erste Tasche des Gels 10 µl Proteinstandard "Ladder" pipettiert und in die restlichen die zu untersuchenden Proben.

Die Elektrophoresekammer wurde an das Power Supply Power Pac 300 angeschlossen und dieses wie folgt eingestellt: 70 Volt für 30 Minuten (Proben in das Gel einwandern lassen) und 125 Volt für 60 Minuten (Proteine der Länge nach auftrennen).

3.3.4. Geltransfer

Zunächst wurden pro Gel zwei extra thick blot paper und eine PVDF-Membran zurecht geschnitten. Die Membranen wurden für zwei bis drei Minuten in Methanol eingelegt, anschließend mit Aqua destillata gewaschen und wiederum zwei bis drei Minuten in

Methoden

Transferpuffer gelegt. Auch die blot paper werden in Transferpuffer getränkt und eines in die semi-dry-Blotchamber eingelegt. Darauf folgen die getränkten Membranen, die Gele und ein weiteres blot paper. Die Blotchamber wird verschlossen und wird ihrerseits an das Supply Power Pac 300 angeschlossen. Dieses wird wie folgt eingestellt: maximal 25 Volt, 0,25 Ampere für eine Stunde.

3.3.5. Transferkontrolle mit Ponceau- Rot

Die Membranen wurden zur Transferkontrolle kurz in Ponceau-Rot eingelegt und mehrmals mit Aqua destillata gewaschen. Bei erfolgreichem Blot leuchten nun die Banden der Proteine rot auf der Membran auf.

3.3.6. Antikörper – Inkubation, p-p70s6K

Es folgte das einstündige „Blocken“ der Membranen mit dreiprozentiger Milch in TBST (x ml TBS [10-fach konzentriert] + 9 * x ml Aqua destillata + 0,01 * x ml Tween) und im Anschluss das dreimalige Waschen mit TBST.

Der primäre Antikörper gegen die p-p70s6K wurde in einem Verhältnis 1:1000 in einprozentiger Milch in TBST gelöst und die Membranen in der Lösung über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach 12 Stunden wurden die Membranen erneut dreimal in TBST gewaschen.

Nun wurden die Membranen wiederum für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper Anti-rabbit IgG mit gekoppelter HRP im Verhältnis 1:2000 in einprozentiger Milch in TBST bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder schloss sich ein dreimaliges Waschen der Membranen in TBST an.

Zuletzt wurden die Membranen mit SuperSignal® ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate Lösung (bestehend aus x ml Luminol und Stable Peroxide und 2 * x ml Aqua destillata) bedeckt. Im Entwicklungsraum für Röntgenfilm wurden mehrere Röntgenfilme mit unterschiedlicher Dauer auf die Membranen gelegt entwickelt.

Um die entstandenen Banden jedoch beurteilen zu können, benötigt man zusätzlich noch eine Positivkontrolle, hier β -Actin. Es kann davon ausgegangen werden, dass Proben mit gleicher Menge an Protein – wie im Western Blot vorgesehen – gleiche Menge an β -Actin enthalten. Bevor β -Actin auf der Membran detektiert werden konnte, mussten alle gebundenen Antikörper abgelöst werden, es wurde „gestrippt“.

3.3.7. Stripping

Der Strippingbuffer (Herstellung: 43,7 ml 1,5M Tris-HCl (pH 6,8; 4°C); 100 ml SDS (20%); 7 ml β -Mercaptoethanol 100 mM; mit Aqua destillata auf einen Liter aufgefüllt) wurde im Abzug auf

Methoden

circa 50°C erhitzt und die Membranen darin für 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit TBST.

3.3.8. Antikörper – Inkubation, β -Actin

Das Vorgehen ist mit dem unter Punkt 3.3.8. zu vergleichen, nur die Antikörper und deren Konzentration in Milch unterscheiden sich.

Der primäre Antikörper β -Actin (mouse anti human) wurde im Verhältnis 1:20.000 – 1:50.000 in einprozentiger Milch in TBST gelöst und die Membranen darin bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert, anschließend dreimal 5 – 10 Minuten in TBST gewaschen. Es folgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper Anti-rabbit IgG mit HRP in einprozentiger Milch in einem Verhältnis 1:2.000 über eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wiederum Zugabe von SuperSignal® ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate Lösung und Abfilmen der Membranen.

3.4. Bestimmung der Everolimuskonzentration mittels LC-MS/MS

LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie) ist eine spezielle Methode zur Bestimmung der Konzentrationen wasserlöslicher Substanzen. Anwendung findet sie beispielsweise beim Arzneimittelmonitoring von Sirolimus, Everolimus und Ciclosporin A, aber auch in der Lebensmittelchemie bei der Überwachung von Pflanzenschutzmittel- und Mykotoxinbelastung. In dem Analysesystem sind Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS) hintereinander installiert, um die Einzelbestandteile der Substanzen erst aufzutrennen und dann zu analysieren [90, 91]. Durchgeführt wurde die Analyse im Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern.

3.5. Abhängigkeit der Everolimuslöslichkeit von der Proteinkonzentration

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Everolimuslöslichkeit von der Proteinkonzentration in Lösung wurde folgender Versuchsaufbau gewählt:

In Eppendorf Tubes der Größe 1,5 Milliliter wurde jeweils 1 Milliliter Flüssigkeit verschiedener Zusammensetzung gegeben. Diese werden anhand folgender Tabelle verdeutlicht.

Menge FCS in μl	\approx prozentualer Anteil FCS an der Lösung	Menge DMEM in μl	\approx prozentualer Anteil DMEM an der Lösung	Everolimus (10 nM)
0	0	990	100	+ 10 μl
99	10	891	90	
198	20	792	80	
297	30	693	70	
396	40	594	60	
495	50	495	50	
594	60	396	40	
693	70	297	30	
792	80	198	20	
891	90	99	10	
990	100	0	0	

Anschließend wurde die Proben eingefroren und die Everolimuskonzentration mittels LC-MS/MS bestimmt.

3.6. Adsorption von Everolimus

3.6.1. Reine Adsorption an Oberflächen

Zur Überprüfung der Everolimus-Adsorption an die Oberfläche von verschiedenen Zellkulturflaschen wurde Medium mit einer bestimmten Medikamentenkonzentration aufgebracht und die Konzentration im Medium und an der Oberfläche nach einer Stunde Inkubationszeit gemessen.

Eine Lösung aus 15 ml Medium (DMEM) mit 10 bzw. 30 % FCS und 15 μl Everolimus (50 μM in DMSO, entspricht einer Everolimuskonzentration von 47,91 $\mu\text{g/l}$) wurde im Falcon Röhrchen angesetzt, ein Milliliter Probe entnommen und 10 ml der Lösung in die Zellkulturflasche eingebracht. Die einstündige Inkubation erfolgte unter Lichtentzug und bei Raumtemperatur, anschließend wurde aus den Zellkulturflaschen ein Milliliter Probe entnommen (= Konzentration Überstand).

Danach wurde die Oberfläche der Zellkulturflasche mit 10 ml DPBS gespült und 5 ml DMSO aufgebracht. Nach einer erneuten, einstündigen Inkubation unter Lichtentzug und bei Raumtemperatur folgte wiederum eine Probenentnahme von einem Milliliter (= Konzentration

Methoden

Ablösung oder Adsorption). Als Zellkulturflaschen wurden getestet: Collagen-beschichtet, Nunclon, Poly-D-Lysin-beschichtet, Ultra-low-attachment, Unbehandelt, Weichglas, des weiteren Duranglas-Petrischalen. Medium sowohl mit 10% als auch mit 30% FCS wurde verwendet. Schematisch ist das Vorgehen für eine Kulturflasche hier aufgeführt, die Anzahl der Einzelversuche pro Zellkulturflaschenart und FCS-Konzentration betrug hier 8.

Vorgang je Kulturflasche	
Beschichten	10 ml DMEM mit 10 bzw. 30% FCS + 10 µl Everolimus (50 µM in DMSO) für eine Stunde
Spülen	10 ml DPBS
Ablösen	5 ml DMSO für eine Stunde

3.6.2. Adsorption an Oberflächen und Zellwachstum

Es wurde der Effekt des adsorbierten Everolimus auf das Zellwachstum untersucht. Hierfür wurden eine Wachstumskontrolle ohne Everolimus und zwei verschiedene Everolimuskonzentrationen – 2,9 und 9,6 µg/l – als Versuchsaufbau gewählt, die Anzahl der Einzelversuche pro Konzentration und Zellkulturflaschenart beträgt hier 8 (293T und VSMC) bzw. 6 (HUVEC).

Es wurden 15 ml Medium mit 10% FCS mit 4,5 µl Everolimus (10 µM in DMSO, entspricht einer Konzentration von 2,9 µg/l Everolimus) bzw. 15 µl Everolimus (10 µM in DMSO, entspricht einer Konzentration von 9,6 µg/l Everolimus) in einem Falcon Röhrchen gemischt. Anschließend wurden 10 ml dieser Lösung auf den Boden der Zellkulturflaschen aufgebracht und eine Stunde unter Lichtentzug inkubiert. Nun wurde der Boden der Zellkulturflasche mit 10 ml DPBS gespült und 20 ml Medium mit 10 % FCS in dieselbe Zellkulturflasche vorgelegt. Je nach Zellart und Wachstumsgeschwindigkeit wurden 600.000 (VSMC und HUVEC) beziehungsweise eine Million Zellen (293T) zugegeben. Nach 48 Stunden im Brutschrank zählte man die Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer aus und lysierte sie abschließend. Die Proben wurden bei -80° C eingefroren. Schematisch ist das Vorgehen für eine Kulturflasche hier aufgeführt.

Vorgang je Kulturflasche	0 µg/l Everolimus	2,9 µg/l Everolimus	9,6 µg/l Everolimus
Beschichten	-	10 ml Medium mit 10% FCS + 3 µl Everolimus (10 µM in DMSO) für eine Stunde	10 ml Medium mit 10% FCS + 10 µl Everolimus (10 µM in DMSO) für eine Stunde
Spülen	-	10 ml DPBS	10 ml DPBS
Medium vorlegen	20 ml Medium mit 10% FCS	20 ml Medium mit 10% FCS	20 ml Medium mit 10% FCS
Zellen einbringen	1 Mio. (T293) bzw. 600.000 (VSMC, HUVEC)	1 Mio. (T293) bzw. 600.000 (VSMC, HUVEC)	1 Mio. (T293) bzw. 600.000 (VSMC, HUVEC)
Wachstum abwarten	48 h	48 h	48 h
Zählen und lysieren			

3.7. ELISA

3.7.1. p-p70s6K-ELISA

Nach der Lyse der Zellen aus den Adsorptionsversuchen mit HUVEC und der Extraktion der zellulären Proteine (siehe Punkt 3.6.2.) folgte die Inkubation der Proben mit Sample Treatment-Puffer für 20 Minuten, anschließend wurde die mindestens fünffache Menge an Standardverdünnungspuffer zugegeben.

Zur Vorbereitung des ELISA wurde der p70s6K [pT389]- Standard ebenfalls mit Standardverdünnungspuffer nach Anleitung auf den Behältern versetzt. Dieses Mischverhältnis entspricht 100 Units/ml. Im Anschluss an eine zehnminütige Ruhephase der Lösung folgte die weitere Verdünnung der Lösung mittels Standardverdünnungspuffer, um die Konzentrationen 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, und 1,6 Units/ml zu erreichen.

Der Antikörper Anti-Rabbit IgG HRP wurde auf Raumtemperatur gebracht und pro 8 Wells 10 µl davon mit einem Milliliter HRP- Verdünnung gemischt. Auch das Waschpufferkonzentrat sollte erst Raumtemperatur erreicht haben, bevor es in einem Verhältnis von 1:25 mit Aqua destillata verdünnt wurde.

Methoden

Nun wurden die ersten Wells der Multiwell Platten mit 50 µl des Standard- Verdünnungspuffers befüllt, die anderen jeweils mit 50 µl der Standards oder der vorverdünnten Proben. Zusätzlich folgten 50 µl p70-S6K [pT389]- Detection- Antikörper in allen Wells bis auf jene, die für Chromogen-Blanks reserviert sind.

Die Platten wurden abgedeckt und für 3 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran folgt das Verwerfen der Lösungen in den Wells und das viermalige Waschen der Oberflächen sowie die Zugabe von 100 µl der vorverdünnten Anti-Rabbit IgG HRP-Lösung in jedes Well. Die Platten wurden abgedeckt wieder 30 Minuten inkubiert, gefolgt von einem erneuten Waschschrift (siehe oben). In jedes Well wurden jetzt 100 µl stabilisiertes Chromogen vorgelegt und die Platten unter Lichtentzug erneut 30 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung beendet und die Platten im Mikrotiterplattenphotometer bei 450nm Wellenlänge ausgelesen (vergleiche [92]).

Die Anzahl der Einzelversuche beträgt hier 5 – 6.

3.7.2. VEGF- ELISA

Das zu untersuchende Lysat stammt wiederum aus den Vorversuchen mit HUVEC-Zellen (Aufbereitung siehe Punkt 3.6.2.).

Zur Vorbereitung des ELISA wurde der VEGF- Standard mit einem Milliliter Calibrator Diluent RD5K vermischt (entspricht einer Konzentration von 2000 pg/ml). Nach einer fünfzehnminütigen Ruhepause wurde die Lösung mittels Calibrator Diluent RD5K jeweils auf die Konzentrationen 1000, 500, 250, 125, 62,5 und 31,2 pg/ml verdünnt.

Sobald das Waschpufferkonzentrat Raumtemperatur erreicht hatte, wurde es in einem Verhältnis von 1:25 mit Aqua destillata verdünnt.

Pro Well wurden jetzt 50 µl Assay- Verdünnung RD1W vorgelegt, darauf folgten 200 µl Standard, Kontrolle oder Probe. Anschließend wurde die Lösung, abgedeckt durch einen speziellen Klebestreifen, für zwei Stunden inkubiert.

Danach wurde der Überstand verworfen, die Wells dreimal mit 400 µl Waschpuffer gespült und wiederum 2 Stunden mit 200 µl VEGF Conjugate bedeckt. Es folgte ein weiterer Waschschrift (siehe oben). 200 µl Substratlösung (aus gleichen Teilen der Farbreagenzen A und B) pro Well sollten die Farbreaktion auslösen und wurden 20 Minuten lang auf der Oberfläche inkubiert.

Nun erfolgte die Zugabe von 50 µl Stopp- Lösung pro Well. Innerhalb von 30 Minuten wurde die Dichte der Lösung mittels Mikrotiterplattenphotometer bei 450nm Wellenlänge ausgelesen (vergleiche [93]).

Die Zahl der Einzelversuche liegt hier bei 3 – 6.

4. Ergebnisse

4.1. Everolimuslöslichkeit korreliert mit der Proteinkonzentration

Everolimus liegt in vitro und in vivo größtenteils proteingebunden vor. Protein entspricht in der Zellkultur meist FCS (fetal calf serum). Die Annahme ist naheliegend, dass eine erhöhte Konzentration an FCS im Medium die Löslichkeit von Everolimus verbessert.

Eine Versuchsreihe wurde durchgeführt, in der schrittweise der prozentuale Anteil von FCS an der Gesamtlösung „FCS+DMEM“ erhöht und Messungen der Everolimuskonzentration durchgeführt wurden. Zugegeben wurden 10 µl 10 nanomolarer Everolimuslösung in insgesamt 1 ml Flüssigkeit. Die Messergebnisse sind in Graphik dargestellt.

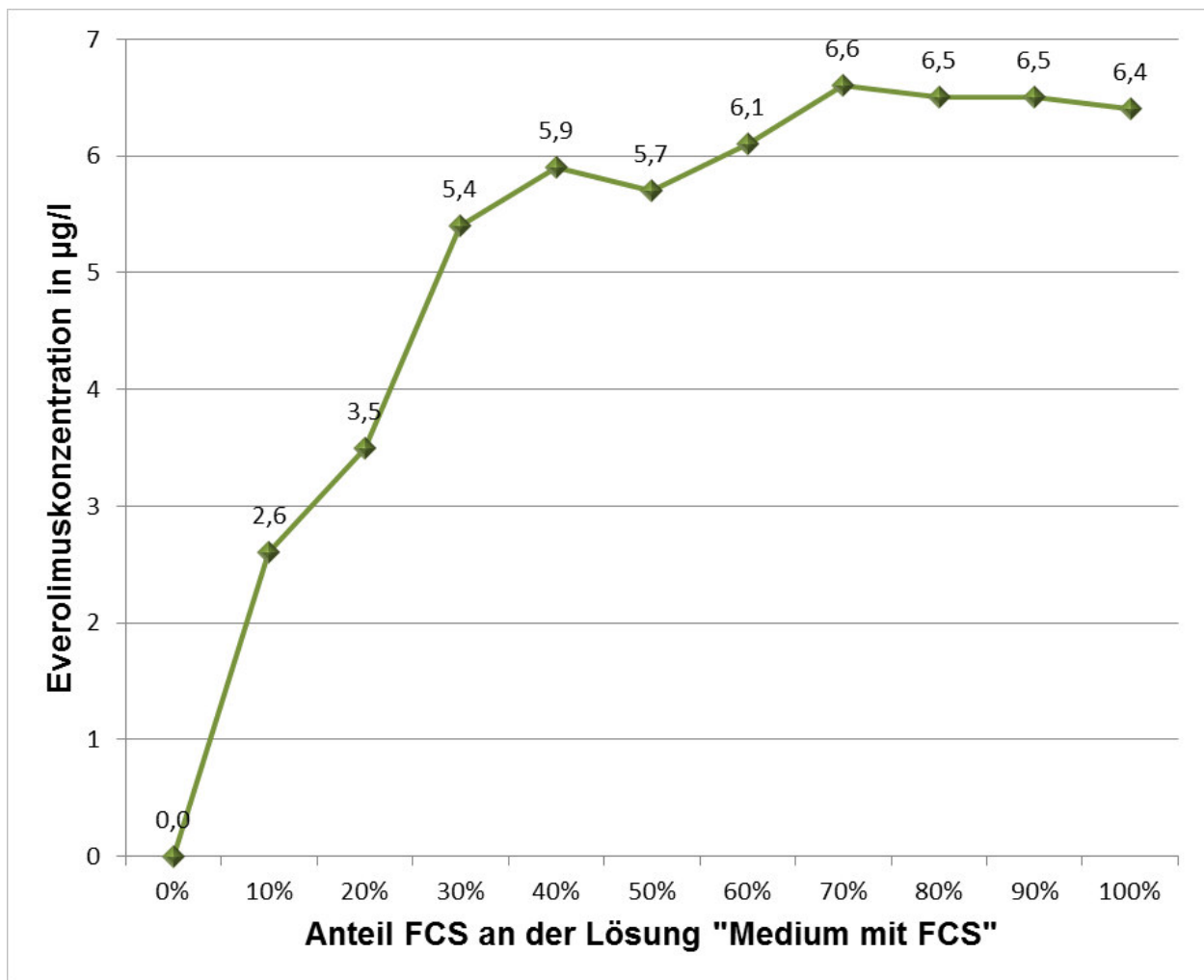


Abbildung 4: Wiederfindungsraten der Everolimuskonzentration in µg/l bei unterschiedlicher FCS-Konzentration in Medium (n=1).

4.2. Everolimusadsorption an Oberflächen

Die Standardkonzentration von FCS in Medium für Zellversuche liegt bei 10%. Im Versuch zu 4.1. zeigt sich jedoch, dass Everolimus bei höherer FCS-Konzentration besser in Lösung zu halten ist. Deshalb wurden für die Adsorptionsversuche sowohl die Standardkonzentration 10% FCS als auch die höhere Konzentration 30% FCS in Medium für Adsorptionsversuche bestimmt. Des Weiteren wurden die folgenden gängigen Zellkulturflaschen ausgewählt: Collagen-beschichtet, Nunclon, Poly-D-Lysin-beschichtet, Ultra-low-attachment, Unbehandelt, Weichglas, darüber hinaus Duranglas-Petrischalen. Alle besitzen mit circa 75 cm² eine vergleichbare Oberfläche.

4.2.1. 10% FCS in DMEM

4.2.1.1. *Darstellung Messergebnisse*

Nach einstündiger Inkubation von 47,91 µg/l Everolimus in DMEM mit 10% FCS auf gängigen Zellkulturflaschen wurden folgende Everolimuskonzentrationen in Überstand und Ablösung gemessen. Die Zellkulturflaschen sind nach absteigender Adsorption (=Ablösung) in Bezug auf 100 % der Summe Überstand + Ablösung geordnet.

Material	Überstand in µg/l (±Standardabweichung)	Ablösung in µg/l (±Standardabweichung)
Ultra low attachment	2,10 (± 0,37)	14,29 (± 1,63)
Unbehandelt	6,19 (± 0,72)	9,62 (± 2,13)
Collagen 1	5,59 (± 0,71)	6,05 (± 1,29)
Nunclon	4,60 (± 0,96)	3,24 (± 0,92)
Poly-D-Lysin	5,40 (± 0,80)	3,32 (± 0,93)
Weichglas-Flaschen	7,83 (± 2,11)	3,85 (± 2,42)
Duranglas-Petrischalen	9,21 (± 1,20)	1,28 (± 0,28)

Stellt man die Summe aus Überstand und Ablösung als 100 % dar, ergibt sich folgende Graphik.

Ergebnisse

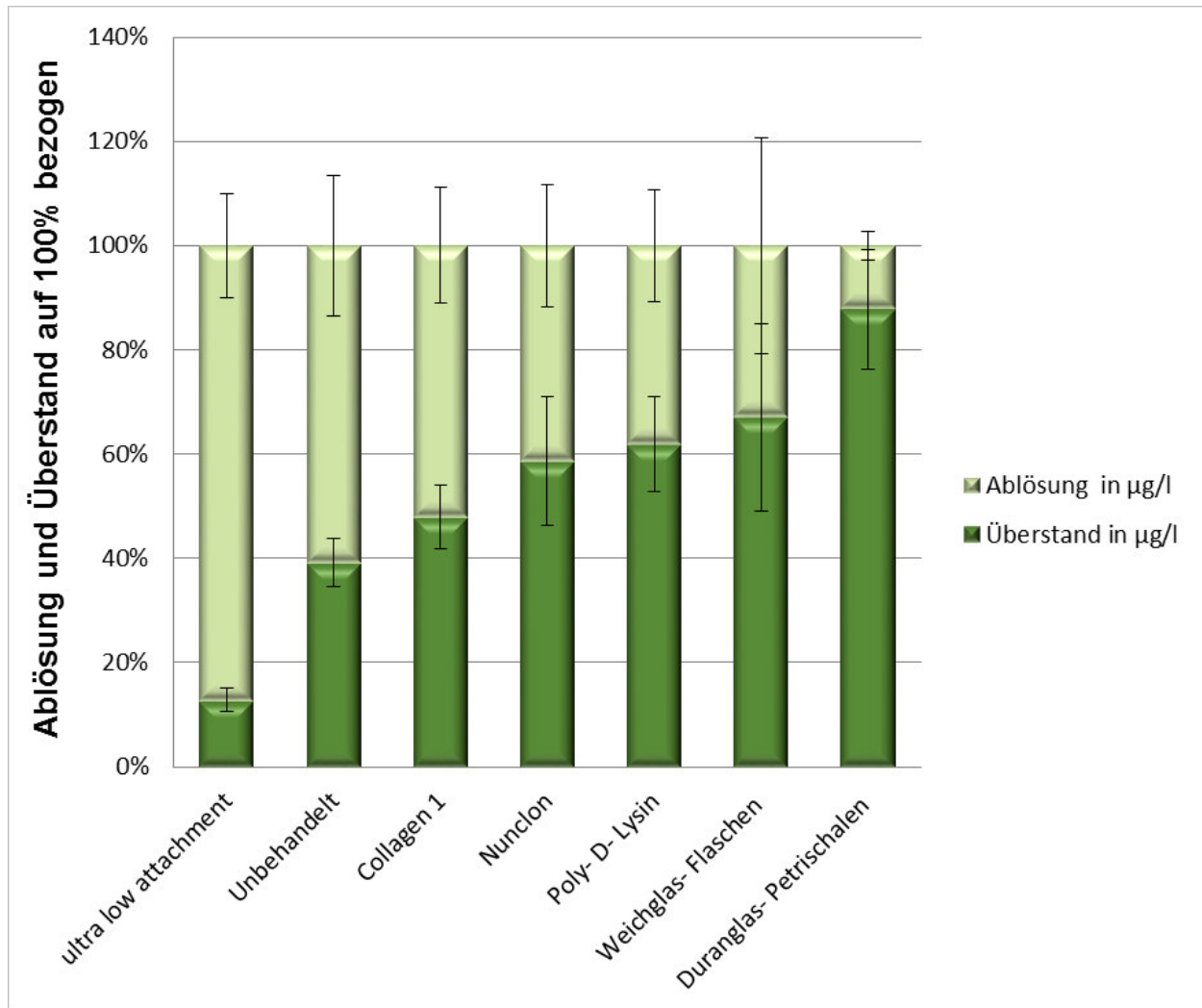


Abbildung 5: Everolimus in DMEM mit 10% FCS nach einstündiger Inkubation in Ablösung und Überstand (=Medium). Beide Werte wurden hier addiert und auf 100% bezogen. Mit Standardabweichungen (n=8).

In dieser Graphik sind Überstand und Ablösung im Zusammenhang mit der ursprünglich zugegebenen Everolimuskonzentration von 47,91 µg/l dargestellt.

Ergebnisse

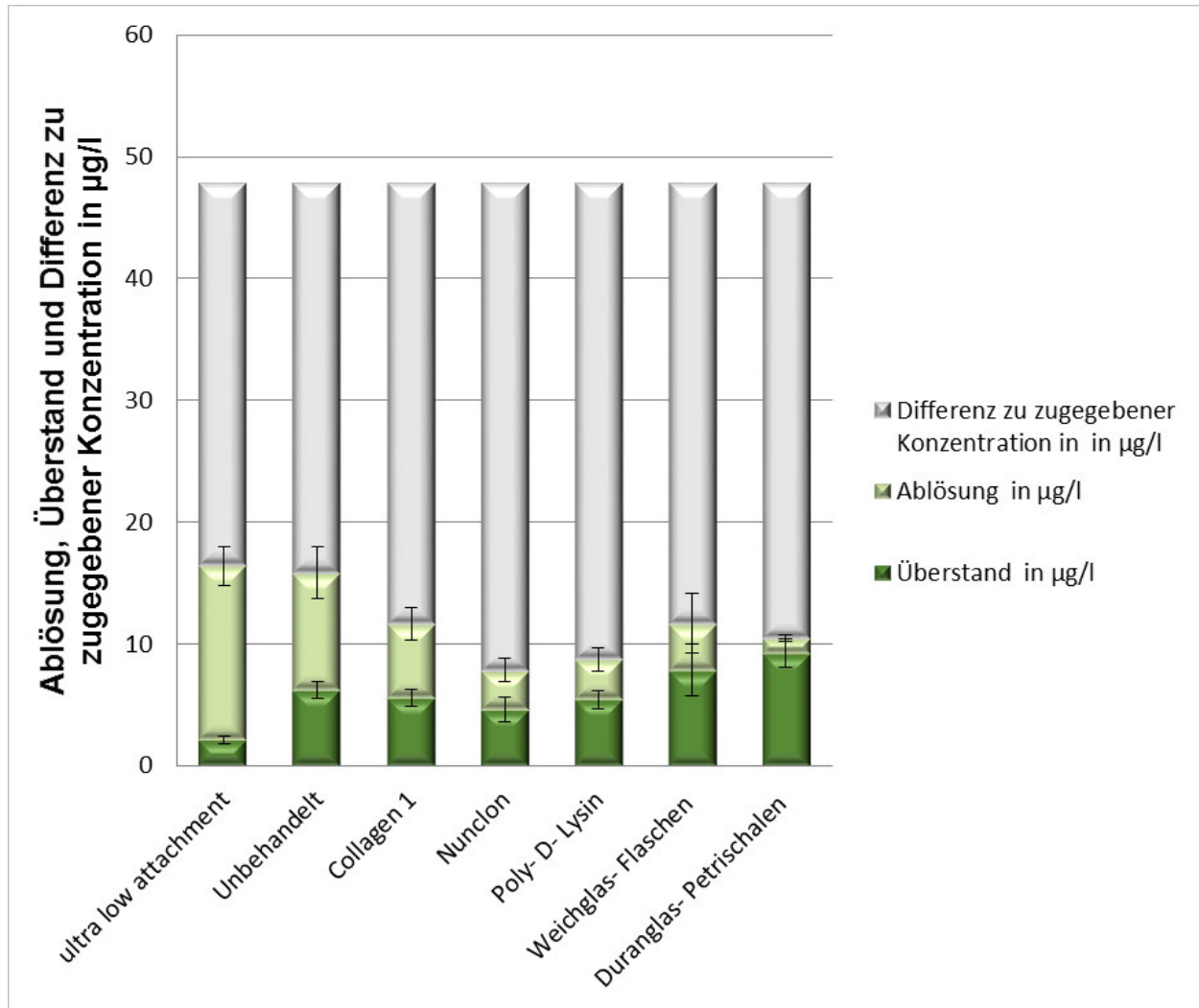


Abbildung 6: Everolimus in DMEM mit 10% FCS nach einstündiger Inkubation in Ablösung, Überstand und Differenz zu zugegebener Everolimuskonzentration von 47,91 µg/l. Mit Standardabweichungen von Ablösung und Überstand (n=8).

Zum Vergleich: berechnet man die Gesamtmenge an Everolimus in den Lösungen nach Zugabe von Medium mit der Gesamtmenge 479,1 ng Everolimus, ergibt sich folgende Graphik und Tabelle:

Material	Everolimus in Überstand in ng (±Standardabweichung)	Everolimus in Ablösung in ng (±Standardabweichung)
Ultra low attachment	21 (± 3,7)	71,5 (± 8,2)
Unbehandelt	61,9 (± 7,2)	48,1 (± 10,7)
Collagen 1	55,9 (± 7,1)	30,25 (± 6,5)

Material	Everolimus in Überstand in ng (\pm Standardabweichung)	Everolimus in Ablösung in ng (\pm Standardabweichung)
Nunclon	46 (\pm 9,6)	16,2 (\pm 4,6)
Poly-D-Lysin	54 (\pm 8,0)	16,6 (\pm 4,6)
Weichglas-Flaschen	78,3 (\pm 21,1)	19,25 (\pm 12,1)
Duranglas-Petrischalen	92,1 (\pm 12,0)	6,4 (\pm 1,4)

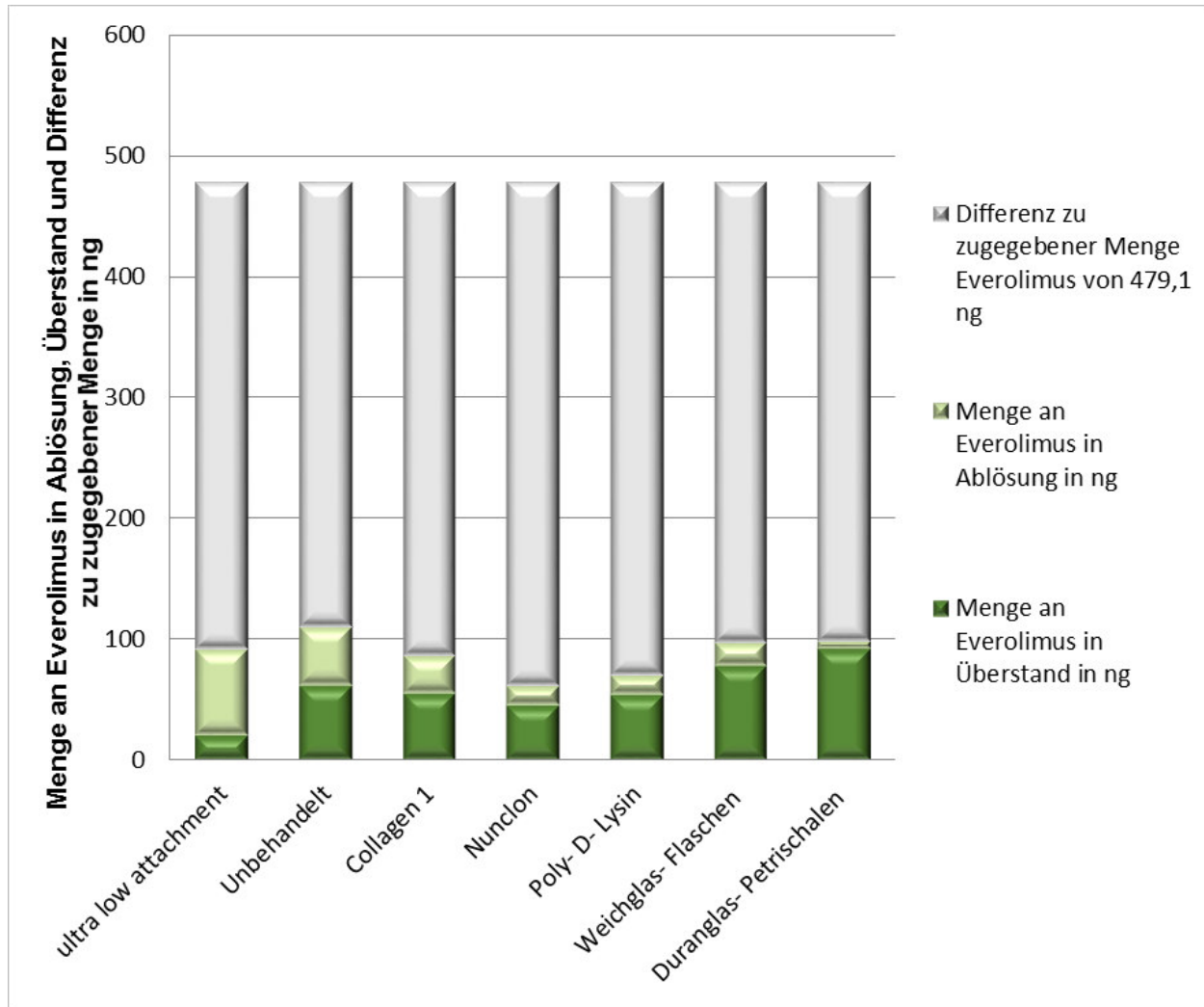


Abbildung 7: Everolimus in DMEM mit 10% FCS nach einstündiger Inkubation in Ablösung, Überstand und Differenz zu zugegebener Everolimusmenge von 479,1 ng.

Ergebnisse

4.2.1.2. Signifikanz

In dieser Tabelle sind die p-Werte zu den Ergebnissen der Konzentrationsunterschiede aufgetragen (verglichen mittels t-Test).

p-Wert	Ultra low attachment	Unbehandelt	Collagen 1	Nunclon	Poly-D-Lysin	Weichglas-Flaschen	Duranglas-Petrischalen
Ultra low attachment	1,0000	0,0001***	0,0000***	0,0000***	0,0000***	0,0000***	0,0000***
Unbehandelt	0,0001***	1,0000	0,0009***	0,0000***	0,0000***	0,0001***	0,0000***
Collagen 1	0,0000***	0,0009***	1,0000	0,0003***	0,0003***	0,0450*	0,0000***
Nunclon	0,0000***	0,0000***	0,0003***	1,0000	0,8727	0,5240	0,0004***
Poly-D-Lysin	0,0000***	0,0000***	0,0003***	0,8727	1,0000	0,5692	0,0000***
Weichglas-Flaschen	0,0000***	0,0001***	0,0450*	0,5240	0,5692	1,0000	0,0198*
Duranglas-Petrischalen	0,0000***	0,0000***	0,0000***	0,0004***	0,0000***	0,0198*	1,0000

* = signifikant, ** = sehr signifikant, *** = höchst signifikant;

4.2.2. 30% FCS in DMEM

4.2.2.1. Darstellung Messergebnisse

Nach einstündiger Inkubation von 47,91 µg/l Everolimus in DMEM mit 30% FCS auf gängigen Zellkulturflaschen wurden folgende Everolimuskonzentrationen in Überstand und Ablösung

Ergebnisse

gemessen. Die Zellkulturflaschen sind nach absteigender Adsorption (=Ablösung) in Bezug auf 100 % der Summe Überstand + Ablösung geordnet.

Material	Überstand in µg/l	Ablösung in µg/l
Ultra low attachment	5,98 (± 1,42)	11,56 (± 1,76)
Unbehandelt	11,11 (± 2,15)	4,06 (± 0,75)
Collagen 1	11,23 (± 3,78)	3,07 (± 0,32)
Weichglas-Flaschen	13,96 (± 1,94)	3,51 (± 2,17)
Nunclon	11,79 (± 1,01)	2,71 (± 0,63)
Poly-D-Lysin	12,24 (± 2,88)	1,67 (± 0,31)
Duranglas-Petrischalen	11,55 (± 2,42)	0,92 (± 0,88)

Ergebnisse

Stellt man die Summe aus Überstand und Ablösung als 100 % dar, ergibt sich folgende Graphik.

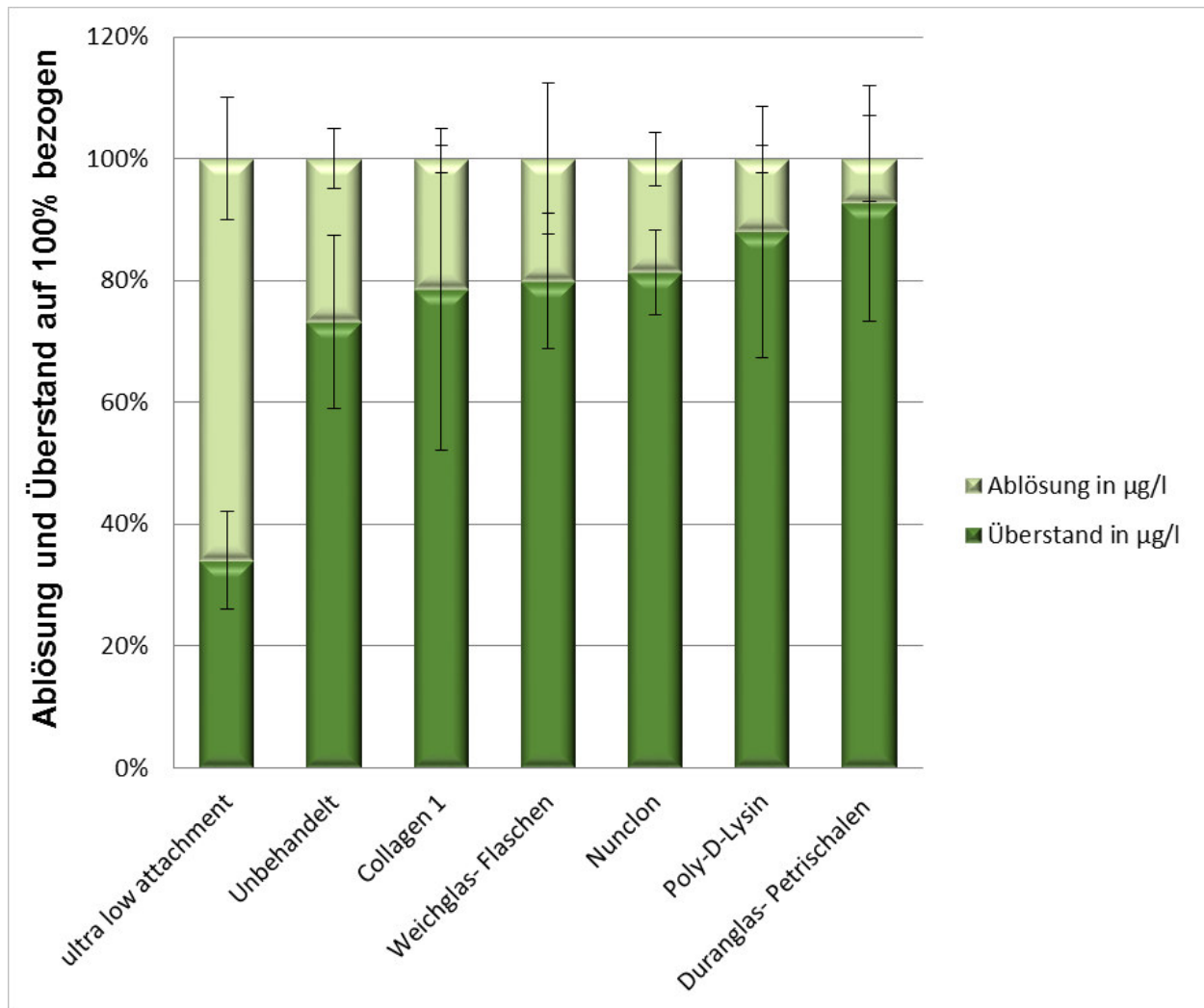


Abbildung 8: Everolimus in DMEM mit 30% FCS nach einstündiger Inkubation in Ablösung und Überstand (=Medium). Beide Werte wurden hier addiert und auf 100% bezogen. Mit Standardabweichungen (n=8).

Ergebnisse

In dieser Graphik sind Überstand und Ablösung im Zusammenhang mit der ursprünglich zugegebenen Everolimuskonzentration von 47,91 µg/l dargestellt.

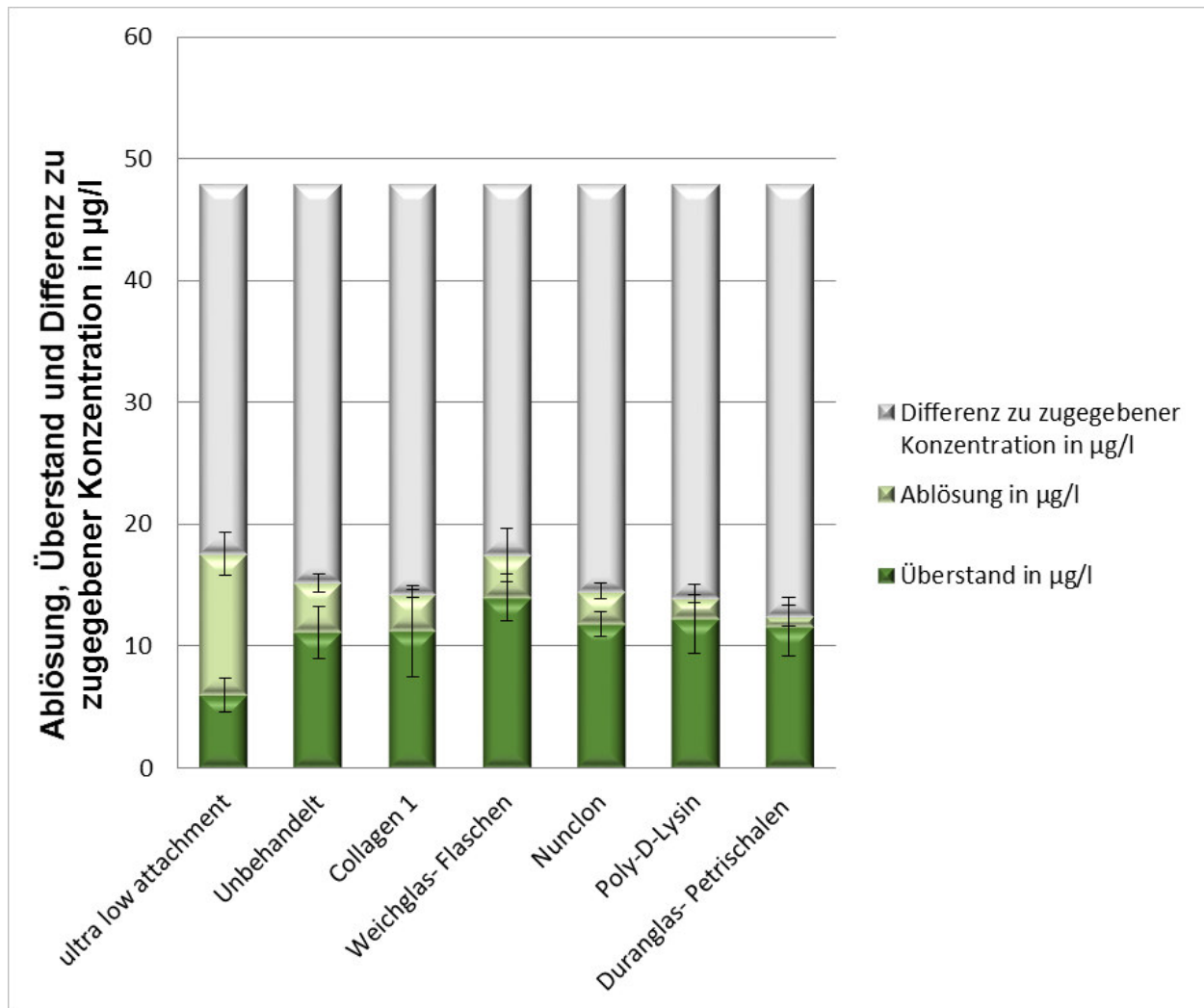


Abbildung 9: Everolimus in DMEM mit 30% FCS nach einstündiger Inkubation in Ablösung, Überstand und Differenz zu zugegebener Everolimuskonzentration von 47,91 µg/l. Mit Standardabweichungen von Ablösung und Überstand (n=8).

Ergebnisse

Zum Vergleich: berechnet man die Gesamtmenge an Everolimus in den Lösungen nach Zugabe von Medium mit der Gesamtmenge 479,1 ng Everolimus, ergibt sich folgende Graphik und Tabelle:

Material	Everolimus in Überstand in ng (\pmStandardabweichung)	Everolimus in Ablösung in ng (\pmStandardabweichung)
Ultra low attachment	59,7 (\pm 14,2)	57,9 (\pm 8,8)
Unbehandelt	111,1 (\pm 21,5)	20,3 (\pm 3,7)
Collagen 1	112,2 (\pm 37,8)	15,3 (\pm 1,9)
Weichglas	139,6 (\pm 19,5)	17,6 (\pm 10,9)
Nunclon	117,9 (\pm 10,1)	13,5 (\pm 3,1)
Poly-D-Lysin	122,4 (\pm 28,9)	8,3 (\pm 1,5)
Duranglas-Petrischalen	115,5 (\pm 24,2)	4,6 (\pm 4,4)

Ergebnisse

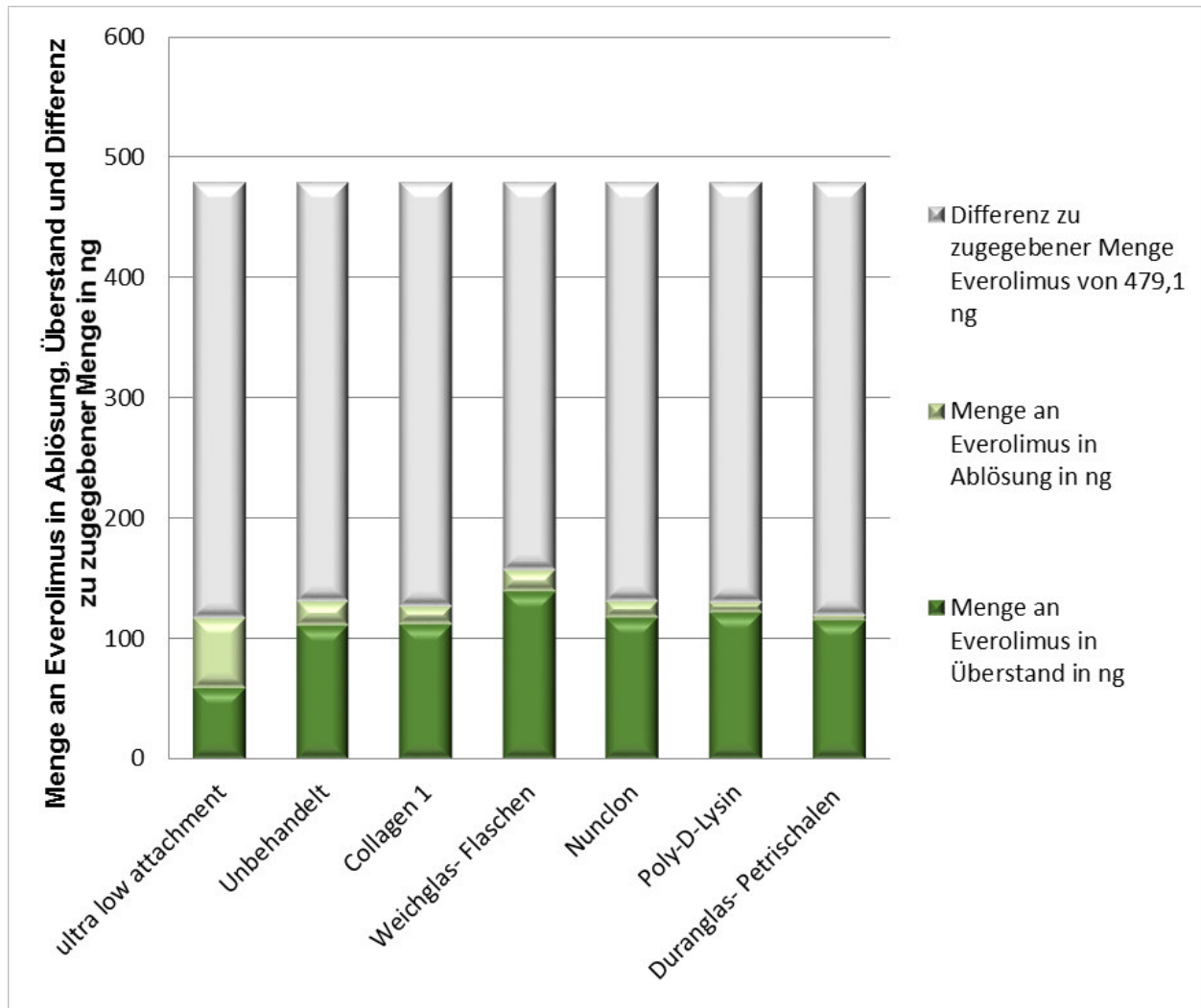


Abbildung 10: Everolimus in DMEM mit 30% FCS nach einstündiger Inkubation in Ablösung, Überstand und Differenz zu zugegebener Everolimusmenge von 479,1 ng.

4.2.2.2. Signifikanz

In dieser Tabelle sind die p-Werte zu den Ergebnissen der Konzentrationsunterschiede aufgetragen (verglichen mittels t-Test).

p-Wert	Ultra low attachment	Unbehandelt	Collagen 1	Weichglas-Flaschen	Nunclon	Poly-D-Lysin	Duranglas-Petrischalen
Ultra low attachment	1,0000	0,0000***	0,0000***	0,0000***	0,0000***	0,0000***	0,0000***
Unbehandelt	0,0000***	1,0000	0,0117*	0,01484*	0,0027**	0,0001***	0,0000***
Collagen 1	0,0000***	0,0117*	1,0000	0,09692	0,1754	0,0000***	0,0001***
Weichglas-Flaschen	0,0000***	0,01484*	0,09692	1,0000	0,01772*	0,1849	0,04607*
Nunclon	0,0000***	0,0027**	0,1754	0,01772*	1,0000	0,0018**	0,0005***
Poly-D-Lysin	0,0000***	0,0001***	0,0000***	0,1849	0,0018**	1,0000	0,04964*
Duranglas-Petrischalen	0,0000***	0,0000***	0,0001***	0,04607*	0,0005***	0,04964*	1,0000

* = signifikant, ** = sehr signifikant, *** = höchst signifikant;

Beim Vergleich d Wertepaare zeigt sich ein signifikanter Unterschied überall bis auf die Paare „Collagen 1 – Nunclon“, „Weichglas – Collagen 1“ und „Weichglas – Poly-D-Lysin“. Dies weist darauf hin, dass die Oberflächen der Kulturflaschen unterschiedlich stark adsorbieren.

4.3. Zellversuche mit Adsorption

Hatte die unterschiedliche Adsorption von Everolimus an Oberflächen auch einen Einfluss auf die Proliferation darauf wachsender Zellkulturen? Um das herauszufinden, wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, bei dem überprüft werden sollte, inwieweit allein adsorbiertes Everolimus eine Proliferationshemmung zur Folge hat. Versuchsaufbau siehe 3.6.2. Als Zelllinien wurden stark proliferierende Fibroblastenzellen 293T, glatte Gefäßmuskelzellen VSMC und Gefäßendothelzellen HUVEC ausgewählt, die FCS-Konzentration beträgt 10% in Medium.

4.3.1. Zellzählung

Primär wurden verschiedene Einzelversuche anhand der Zellzahlen verglichen. Als Ausgangswert dienten immer circa eine Million Zellen (293T) beziehungsweise 600.000 Zellen (VSMC und HUVEC) in Medium mit 10 % FCS. Teil eines Einzelversuches waren der Vergleichbarkeit halber je eine Zellkulturflasche mit 0 µg/l Everolimus, eine mit 2,9 µg/l Everolimus und eine mit 9,6 µg/l Everolimus in der Beschichtungslösung. Die Zahl der Einzelversuche lag hier jeweils bei 8 (293T und VSMC) beziehungsweise bei 6 (HUVEC).

4.3.1.1. *Einfache Zellzählung*

293T

In unten gezeigter Tabelle und Graphik sind die Mittelwerte der Zellzahlen nach zwei Tagen Wachstum mit Standardabweichung dargestellt.

Zellkulturflasche	Mittelwert 293T in Millionen bei 0 µg/l Everolimus	Mittelwert 293T in Millionen bei 2,9 µg/l Everolimus	Mittelwert 293T in Millionen bei 9,6 µg/l Everolimus
Nunclon	4,72 (± 1,34)	3,25 (± 1,15)	1,96 (± 0,65)
Collagen 1	4,03 (± 0,78)	3,52 (± 1,01)	2,33 (± 0,49)
Unbehandelt	6,43 (± 2,55)	5,59 (± 1,90)	4,09 (± 1,58)
Duranglas	4,86 (± 1,17)	4,04 (± 1,26)	3,04 (± 0,98)

Ergebnisse

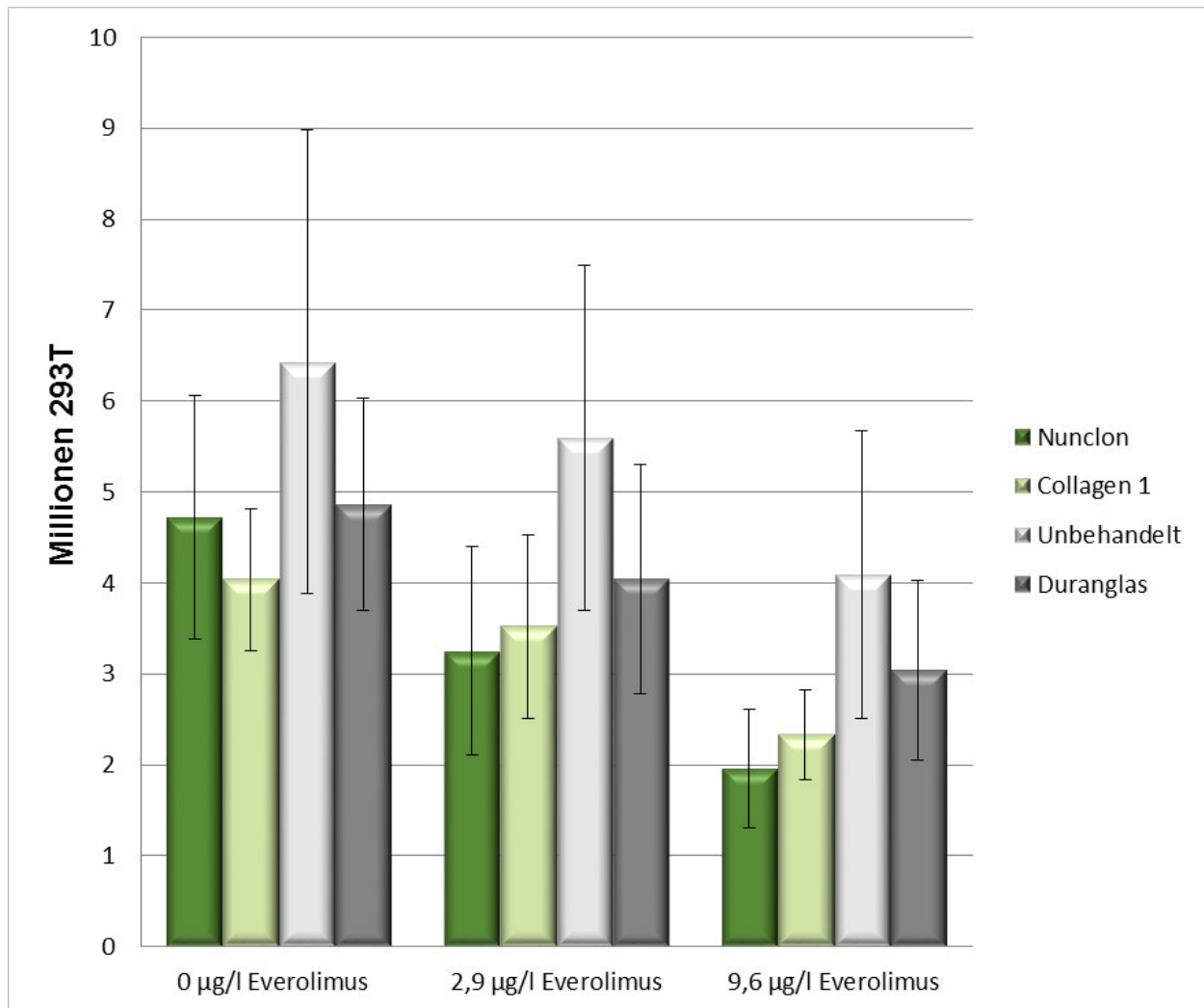


Abbildung 11: Millionen 293T nach zweitägigem Wachstum auf verschiedenen Zellkulturflächen mit 0/ 2,9 und 9,6 µg/l Everolimus beschichteter Oberfläche. Mit Standardabweichungen (n=8).

In dieser Tabelle sind die p-Werte der Zellzahlen innerhalb einer Zellkulturflaschenart aufgezeichnet (verglichen mittels t-Test).

Zellkulturflasche	p-Wert (Zellzahl 0 zu 2,9 µg/l Everolimus)	p-Wert (Zellzahl 2,9 zu 9,6 µg/l Everolimus)	p-Wert (Zellzahl 0 zu 9,6 µg/l Everolimus)
Nuncion	0,0044**	0,0020**	0,0007***
Collagen 1	0,3515	0,0058**	0,0003***
Unbehandelt	0,2192	0,01675*	0,0036**
Duranglas	0,1427	0,0937	0,0024**

* = signifikant, ** = sehr signifikant, *** = höchst signifikant

Ergebnisse

In folgender Tabelle sind zudem die p-Werte der Wachstumszahlen zwischen den einzelnen Zellkulturflaschen bei 0, 2,9 und 9,6 µg/l Everolimus aufgezeichnet (vergleichen mittels t-Test).

p-Wert bei 0 µg/l Everolimus	Nunclon	Collagen 1	Unbehandelt	Duranglas
Nunclon	1,0000	0,1990 (1) bzw. 0,2027 (2)	0,1100 (1) bzw. 0,1186 (2)	0,8204 (1) bzw. 0,2113 (2)
Collagen 1	0,1990 (1) bzw. 0,2027 (2)	1,0000	0,02362 (1)* bzw. 0,0338 (2)*	0,1183 (1) bzw. 0,1215 (2)
Unbehandelt	0,1100 (1) bzw. 0,1186 (2)	0,02362 (1)* bzw. 0,0338 (2)*	1,0000	0,1365 (1) bzw. 0,1459 (2)
Duranglas	0,8204 (1) bzw. 0,2113 (2)	0,1183 (1) bzw. 0,1215 (2)	0,1365 (1) bzw. 0,1459 (2)	1,0000
p-Wert bei 2,9 µg/l Everolimus	Nunclon	Collagen 1	Unbehandelt	Duranglas
Nunclon	1,0000	0,6229 (1) bzw. 0,6230 (2)	0,0098 (1) ** bzw. 0,0118 (2) *	0,2111 (1) bzw. 0,2113 (2)
Collagen 1	0,6229 (1) bzw. 0,6230 (2)	1,0000	0,0165 (1)* bzw. 0,0203 (2)*	0,3800 (1) bzw. 0,3808 (2)
Unbehandelt	0,0098 (1) ** bzw. 0,0118 (2) *	0,0165 (1)* bzw. 0,0203 (2)*	1,0000	0,0743 (1) bzw. 0,0775 (2)
Duranglas	0,2111 (1) bzw. 0,2113 (2)	0,3800 (1) bzw. 0,3808 (2)	0,07434 (1) bzw. 0,0775 (2)	1,0000

Ergebnisse

p-Wert bei 9,6 µg/l Everolimus	Nunclon	Collagen 1	Unbehandelt	Duranglas
Nunclon	1,0000	0,2172 (1) bzw. 0,2188 (2)	0,0034 (1) ** bzw. 0,0061 (2) **	0,0210 (1) * bzw. 0,0231 (2) *
Collagen 1	0,2172 (1) bzw. 0,2188 (2)	1,0000	0,0094 (1) ** bzw. 0,0161 (2) *	0,0883 (1) bzw. 0,0960 (2)
Unbehandelt	0,0034 (1) ** bzw. 0,0061 (2) **	0,0094 (1) * bzw. 0,0161 (2) *	1,0000	0,1335 (1) bzw. 0,1378 (2)
Duranglas	0,02098 (1) * bzw. 0,02307(2) *	0,0883 (1) bzw. 0,0960 (2)	0,1335 (1) bzw. 0,1378 (2)	1,0000

(1)Ungleiche Varianzen, (2) gleiche Varianzen; * = signifikant, ** = sehr signifikant, ***=höchst signifikant;

VSMC

In unten gezeigter Graphik und Tabelle sind die Mittelwerte der Zellzahlen nach zwei Tagen Wachstum mit Standardabweichung dargestellt.

Zellkulturflasche	Mittelwert VSMC in Millionen bei 0 µg/l Everolimus	Mittelwert VSMC in Millionen bei 2,9 µg/l Everolimus	Mittelwert VSMC in Millionen bei 9,6 µg/l Everolimus
Nunclon	1,58 (± 0,62)	1,24 (± 0,56)	1,07 (± 0,33)
Collagen 1	1,17 (±0,32)	0,76 (±0,35)	0,44 (±0,15)
Unbehandelt	1,15 (±0,24)	0,91 (±0,24)	0,72 (±0,38)
Duranglas	1,31 (±0,54)	1,17 (±0,69)	0,95 (±0,41)

Ergebnisse

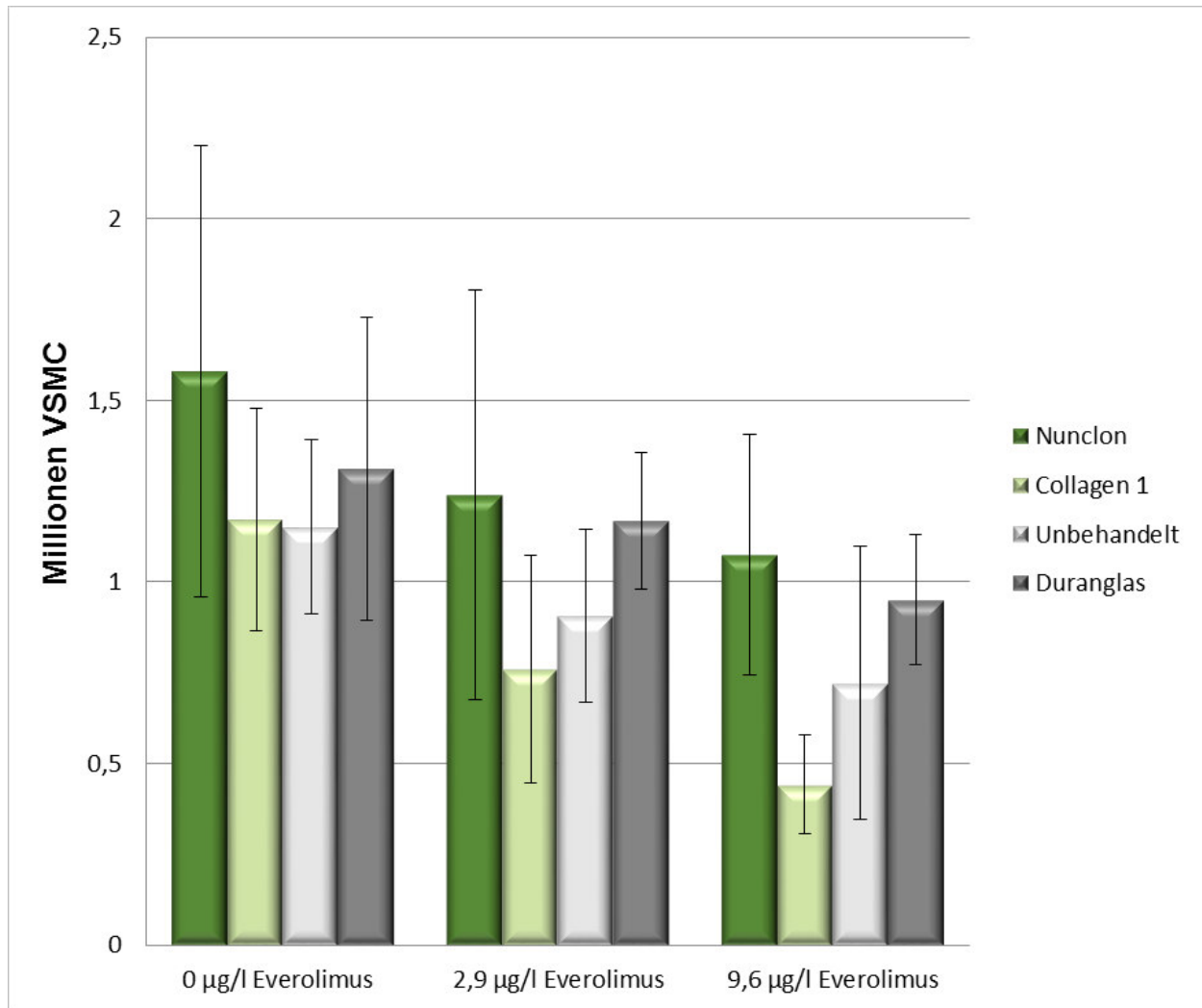


Abbildung 12: Millionen VSMC nach zweitägigem Wachstum auf verschiedenen Zellkulturflächen mit 0/ 2,9 und 9,6 µg/l Everolimus beschichteter Oberfläche. Mit Standardabweichungen (n=8).

In dieser Tabelle sind die p-Werte der Zellzahlen innerhalb einer Zellkulturflaschenart aufgezeichnet (verglichen mittels t-Test).

Zellkulturflasche	p-Wert (Zellzahl 0 zu 2,9 µg/l Everolimus)	p-Wert (Zellzahl 2,9 zu 9,6 µg/l Everolimus)	p-Wert (Zellzahl 0 zu 9,6 µg/l Everolimus)
Nuncion	0,1924	0,3714	0,0074**
Collagen 1	0,0049**	0,0419*	0,0004***
Unbehandelt	0,0341*	0,1874	0,0083**
Duranglas	0,0909	0,8288	0,1231

* = signifikant, ** = sehr signifikant, *** = höchst signifikant;

Ergebnisse

In folgender Tabelle sind die p-Werte der Wachstumszahlen zwischen den verschiedenen Zellkulturflaschen bei 0, 2,9 und 9,6 µg/l Everolimus aufgezeichnet (vergleichen mittels t-Test).

p-Wert bei 0 µg/l Everolimus	Nunclon	Collagen 1	Unbehandelt	Duranglas
Nunclon	<i>1,0000</i>	0,1249 (1) bzw. 0,1311 (2)	0,0898 (1) bzw. 0,1015 (2)	0,3713 (1) bzw. 0,3716 (2)
Collagen 1	0,1249 (1) bzw. 0,1311 (2)	<i>1,0000</i>	0,8960 (1) bzw. 0,8962 (2)	0,5445 (1) bzw. 0,5462 (2)
Unbehandelt	0,0898 (1) bzw. 0,1015 (2)	0,8960 (1) bzw. 0,8962 (2)	<i>1,0000</i>	0,4563 (1) bzw. 0,4618 (2)
Duranglas	0,3713 (1) bzw. 0,3716 (2)	0,5445 (1) bzw. 0,5462 (2)	0,4563 (1) Bzw. 0,4618 (2)	<i>1,0000</i>
p-Wert bei 2,9 µg/l Everolimus	Nunclon	Collagen 1	Unbehandelt	Duranglas
Nunclon	<i>1,0000</i>	0,0737 (1) bzw. 0,0770 (2)	0,1455 (1) bzw. 0,1561 (2)	0,2290 (1) bzw. 0,2294 (2)
Collagen 1	0,0737 (1) bzw. 0,0770 (2)	<i>1,0000</i>	0,4255 (1) bzw. 0,4279 (2)	0,5551 (1) bzw. 0,5558 (2)
Unbehandelt	0,1455 (1) bzw. 0,1561 (2)	0,4255 (1) bzw. 0,4279 (2)	<i>1,0000</i>	0,9884 (1) bzw. 0,9885 (2)
Duranglas	0,2290 (1) bzw. 0,2294 (2)	0,5551 (1) bzw. 0,5558 (2)	0,9884 (1) bzw. 0,9885 (2)	<i>1,0000</i>

Ergebnisse

p-Wert bei 9,6 µg/l Everolimus	Nunclon	Collagen 1	Unbehandelt	Duranglas
Nunclon	1,0000	0,0003 (1)*** bzw. 0,0007 (2)***	0,1455 (1) bzw. 0,0667 (2)	0,2290 (1) bzw. 0,4334 (2)
Collagen 1	0,0003 (1)*** bzw. 0,0007 (2)***	1,0000	0,0744 (1) bzw. 0,0844 (2)	0,0104(1)* bzw. 0,0162 (2)*
Unbehandelt	0,1455 (1) bzw. 0,0668 (2)	0,0744 (1) bzw. 0,0844 (2)	1,0000	0,3413 (1) bzw. 0,3416 (2)
Duranglas	0,2290 (1) bzw. 0,4334 (2)	0,0104 (1)* bzw. 0,0162 (2)*	0,3413 (1) bzw. 0,3416 (2)	1,0000

(1) ungleiche Varianzen, (2) gleiche Varianzen; * = signifikant, ** = sehr signifikant, ***=höchst signifikant;

HUVEC

In unten gezeigter Tabelle und Graphik sind die Mittelwerte der Zellzahlen nach zwei Tagen Wachstum mit Standardabweichung dargestellt.

Zellkulturflasche	Mittelwert HUVEC in Millionen bei 0 µg/l Everolimus	Mittelwert HUVEC in Millionen bei 2,9 µg/l Everolimus	Mittelwert HUVEC in Millionen bei 9,6 µg/l Everolimus
Nunclon	1,15 (±0,40)	0,78 (±0,12)	0,55 (±0,24)
Collagen 1	1,27 (±0,48)	0,80 (±0,04)	0,63 (±0,07)
Unbehandelt	0,82 (±0,29)	0,55 (±0,26)	0,49 (±0,31)
Duranglas	1,55 (±0,42)	0,95 (±0,25)	0,63 (±0,07)

Ergebnisse

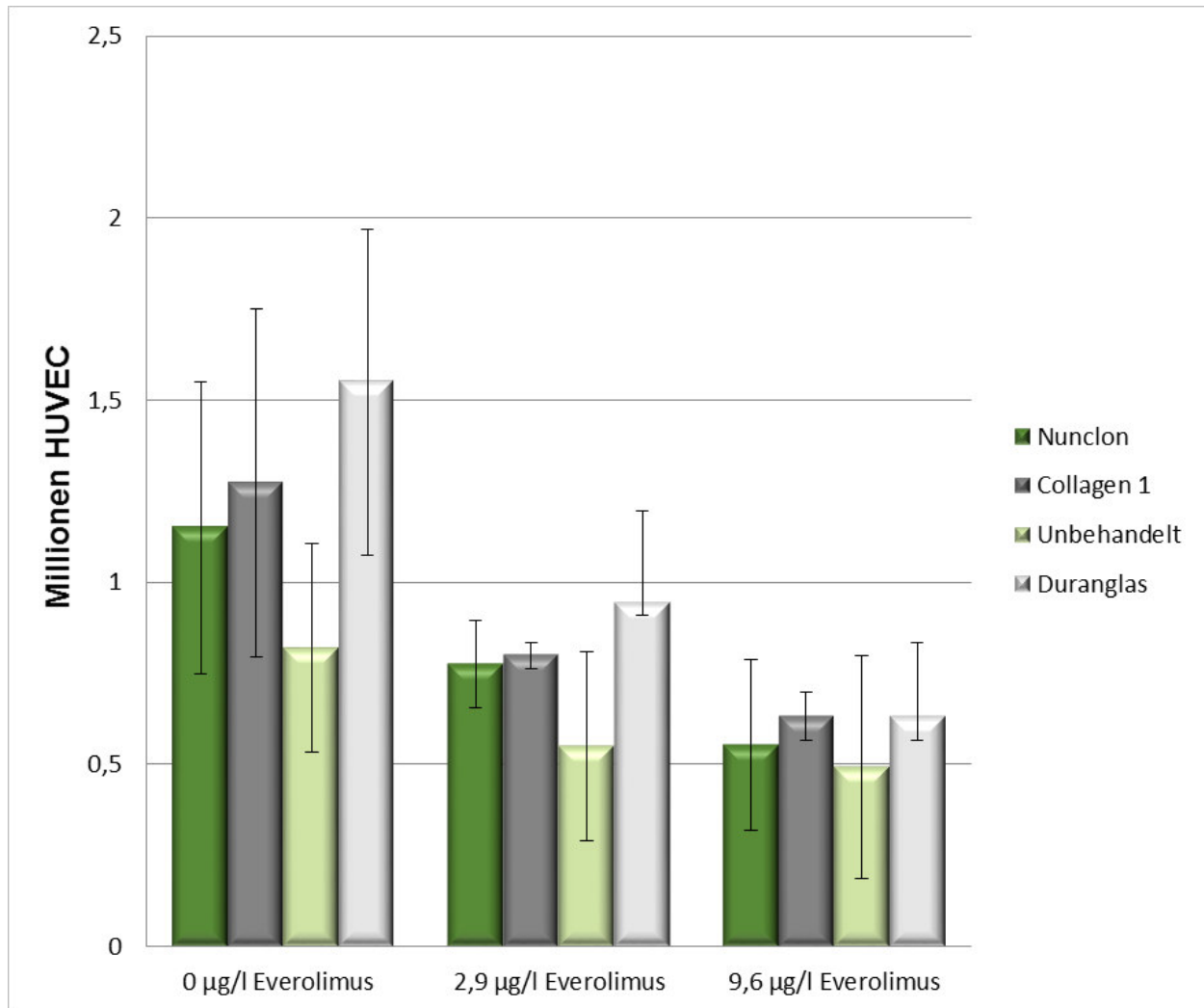


Abbildung 13: Millionen HUVEC nach zweitägigem Wachstum auf verschiedenen Zellkulturflächen mit 0/ 2,9 und 9,6 µg/l Everolimus beschichteter Oberfläche. Mit Standardabweichungen (n= 3 [Collagen 1], 6 [Unbehandelt, Duranglas] und 7 [Nunclon]).

Ergebnisse

In dieser Tabelle sind die p-Werte der Zellzahlen innerhalb einer Zellkulturflaschenart aufgezeichnet (verglichen mittels t-Test).

Zellkulturflasche	p-Wert (Zellzahl 0 zu 2,9 µg/l Everolimus)	p-Wert (Zellzahl 2,9 zu 9,6 µg/l Everolimus)	p-Wert (Zellzahl 0 zu 9,6 µg/l Everolimus)
Nunclon	0,400	0,948	0,014*
Collagen 1	0,683	1,00	0,245
Unbehandelt	0,894	1,00	0,705
Duranglas	0,026	0,769	<0,001***

* = signifikant, ** = sehr signifikant, *** = höchst signifikant;

In folgender Tabelle sind die p-Werte der Wachstumszahlen zwischen den verschiedenen Zellkulturflaschen bei 0, 2,9 und 9,6 µg/l Everolimus aufgezeichnet (verglichen mittels t-Test).

p-Wert bei 0 µg/l Everolimus	Nunclon	Collagen 1	Unbehandelt	Duranglas
Nunclon	<i>1,000</i>	1,000	0,649	0,353
Collagen 1	1,000	<i>1,000</i>	0,542	0,962
Unbehandelt	0,649	0,542	<i>1,000</i>	0,003**
Duranglas	0,353	0,962	0,003**	<i>1,000</i>
p-Wert bei 2,9 µg/l Everolimus	Nunclon	Collagen 1	Unbehandelt	Duranglas
Nunclon	<i>1,000</i>	1,000	0,958	0,995
Collagen 1	1,000	<i>1,000</i>	0,985	1,000
Unbehandelt	0,958	1,000	<i>1,000</i>	0,441
Duranglas	0,995	1,000	0,441	<i>1,000</i>
p-Wert bei 9,6 µg/l Everolimus	Nunclon	Collagen 1	Unbehandelt	Duranglas
Nunclon	<i>1,000</i>	1,000	1,000	1,000
Collagen 1	1,000	<i>1,000</i>	1,000	1,000
Unbehandelt	1,000	1,000	<i>1,000</i>	0,999
Duranglas	1,000	1,000	0,999	<i>1,000</i>

* = signifikant, ** = sehr signifikant, ***=höchst signifikant;

4.3.1.2. Angabe in Prozent Wachstum

Aufgrund von Zählungenauigkeiten, die sich sowohl in den Zahlen zu Beginn des Experiments als auch am Ende dessen zeigten, wurde eine andere Methode zur Evaluierung des Wachstums gewählt. Unter der Annahme, dass die Zellzahlen in der Kontroll-Zellkulturflasche „0 µg/l Everolimus“ 100% Wachstum darstellen, lassen sich die Zellzahlen in den Zellkulturflaschen „2,9 µg/l Everolimus“ und „9,6 µg/l Everolimus“ darauf beziehen und in Prozent Wachstum angeben.

293T

Unten dargestellt sind die Prozent Wachstum innerhalb der einzelnen Zellkulturflaschen mit den unterschiedlichen Konzentrationen und deren Standardabweichungen, je in einer Tabelle und einer Graphik.

Everolimus- konzentration	Prozent Wachstum bei Nuncion (±Standardab- weichung)	Prozent Wachstum bei Collagen 1 (±Standardab- weichung)	Prozent Wachstum bei Unbehandelt (±Standardab- weichung)	Prozent Wachstum bei Duranglas (±Standardab- weichung)
0 µg/l	100	100	100	100
2,9 µg/l	70 (±13,2)	87,5 (±28,1)	92,7 (±10,2)	90,5 (±30,3)
9,6 µg/l	40,9 (±13,2)	59,6 (±10,9)	66,8 (±10,1)	64,4 (±11,4)

Ergebnisse

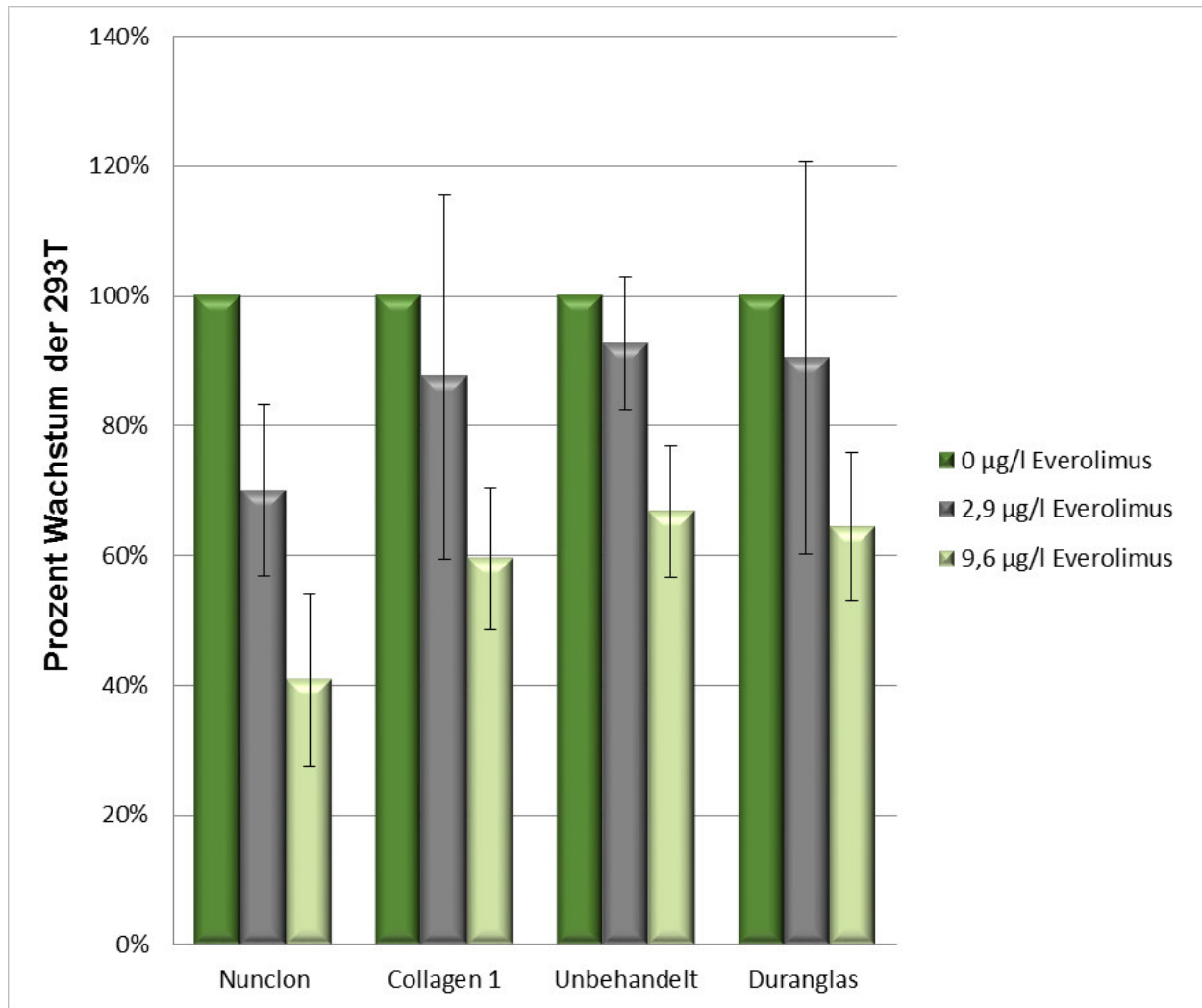


Abbildung 14: Prozentuales Wachstum der 293T in verschiedenen Zellkulturflächen, die mit 0/ 2,9 und 9,6 µg/l Everolimus beschichtet wurden, nach zwei Tagen. Mit Standardabweichungen (n=8).

VSMC

Unten dargestellt sind die Prozent Wachstum innerhalb der einzelnen Zellkulturflaschen mit den unterschiedlichen Konzentrationen und deren Standardabweichungen, je in einer Tabelle und einer Graphik.

Everolimus-konzentration	Prozent Wachstum bei Nunclon (±Standardabweichung)	Prozent Wachstum bei Collagen 1 (±Standardabweichung)	Prozent Wachstum bei Unbehandelt (±Standardabweichung)	Prozent Wachstum bei Duranglas (±Standardabweichung)
0 µg/l	100	100	100	100
2,9 µg/l	82,2 (±29,9)	64,9	82,3 (±18,7)	89,1 (±31,8)
9,6 µg/l	66,8 (±4,0)	37,8	56,9(±31,3)	72,5 (±28,1)

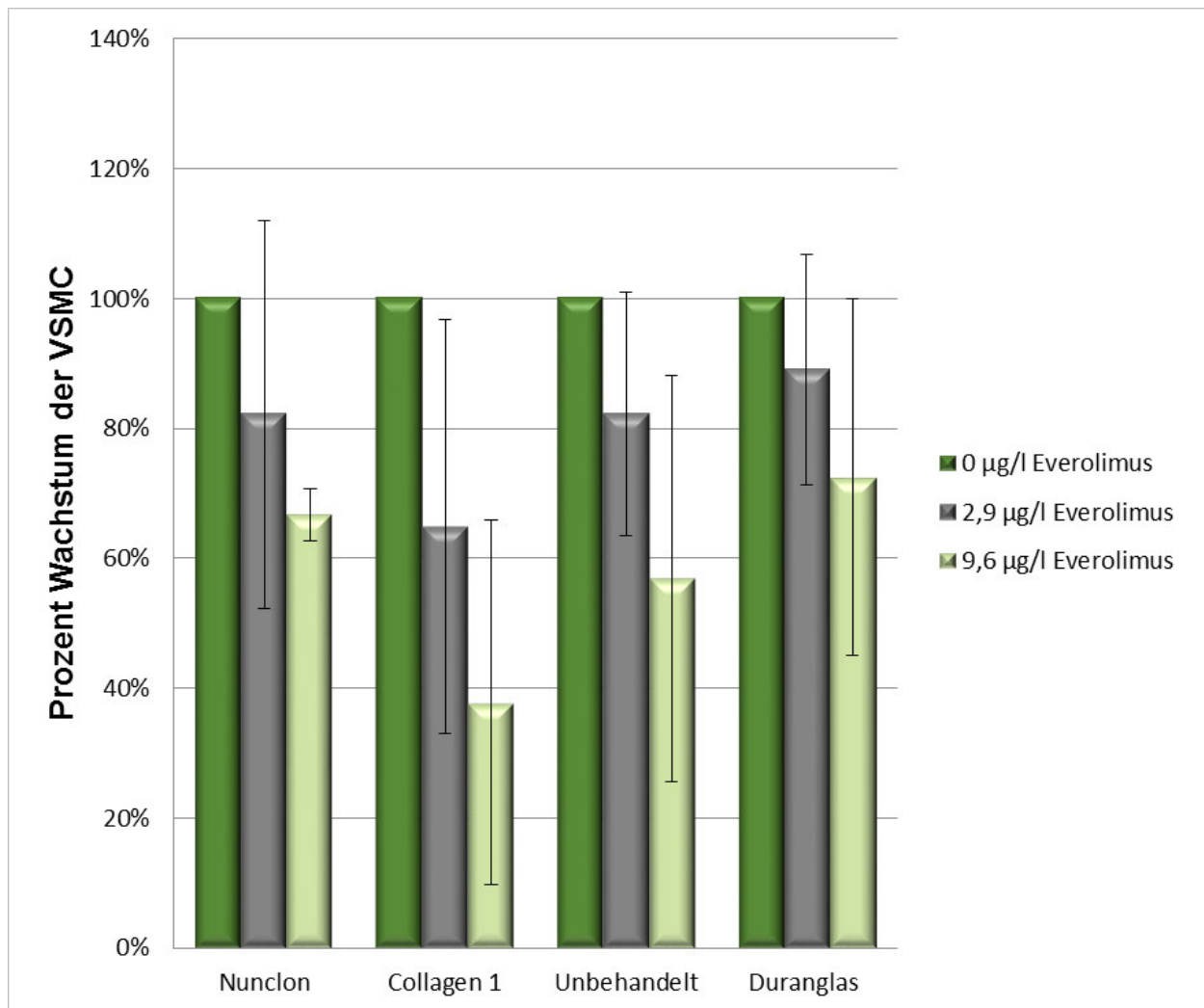


Abbildung 15: Prozentuales Wachstum der VSMC in verschiedenen Zellkulturflächen, die mit 0/ 2,9 und 9,6 µg/l Everolimus beschichtet wurden, nach zwei Tagen. Mit Standardabweichungen von Nunclon, Unbehandelt und Duranglas (n=8).

HUVEC

Unten dargestellt sind die Prozent Wachstum innerhalb der einzelnen Zellkulturflaschen mit den unterschiedlichen Konzentrationen, je in einer Tabelle und einer Graphik.

Everolimus- konzentration	Prozent Wachstum bei Nunclon (± SD)	Prozent Wachstum bei Collagen 1 (± SD)	Prozent Wachstum bei Unbehandelt (± SD)	Prozent Wachstum bei Duranglas (± SD)
0 µg/l	100	100	100	100
2,9 µg/l	75,27 (± 14,31)	72,41 (± 38,32)	68,77 (± 26,16)	62,88 (± 13,74)
9,6 µg/l	48,79 (± 14,31)	57,23 (± 30,12)	59,24 (± 31,52)	43,31 (± 17,84)

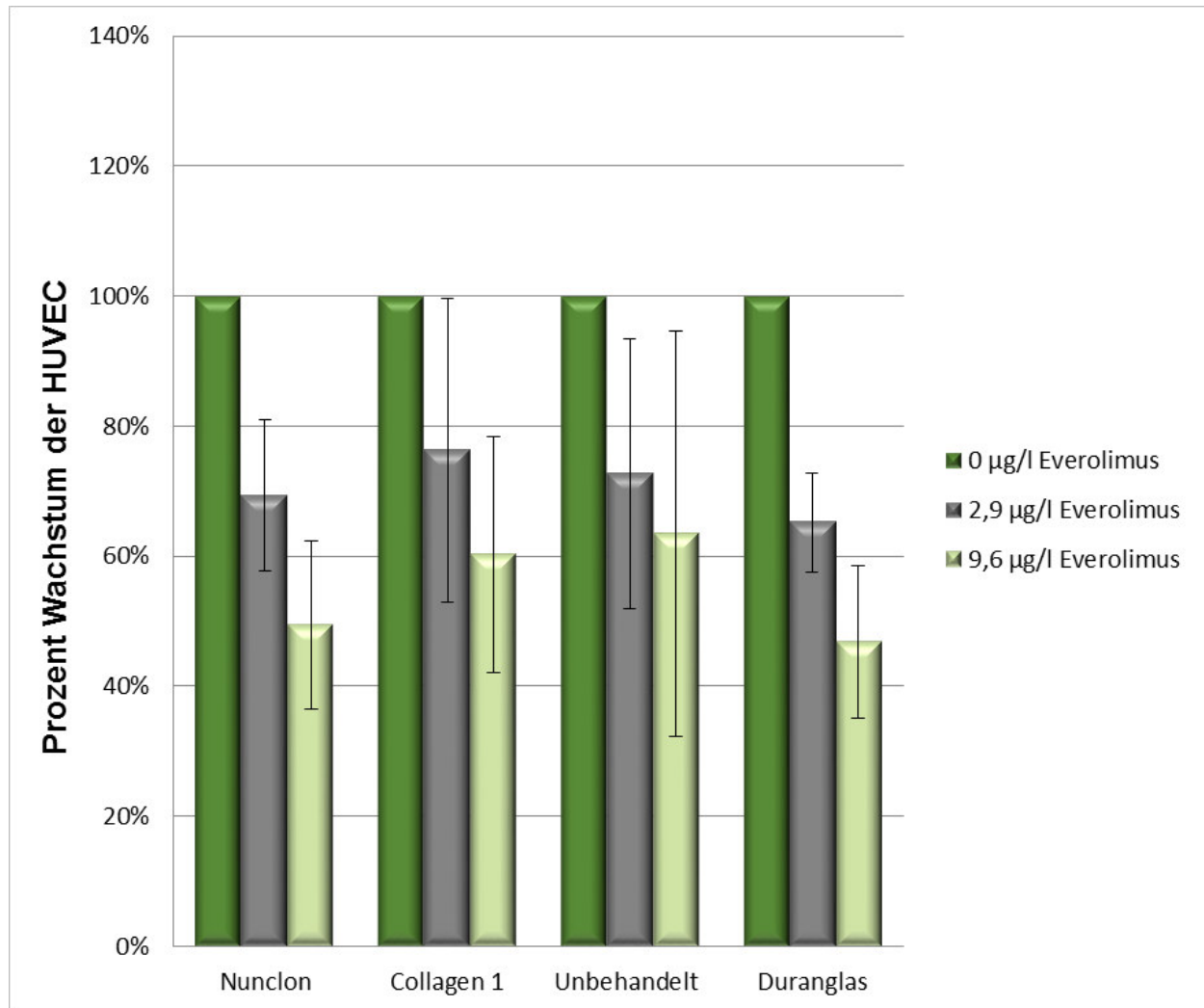


Abbildung 16: Prozentuales Wachstum der HUVEC in verschiedenen Zellkulturflächen, die mit 0/ 2,9 und 9,6 µg/l Everolimus beschichtet wurden, nach 48 Stunden (n= 3 [Collagen 1], 6 [Unbehandelt, Duranglas] und 7 [Nuncion]).

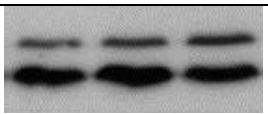
4.4. p-p70s6K- Western Blot

Mit den Lysaten aus den Zellversuchen wurden zusätzlich Western Blots durchgeführt, um die Phosphorylierung der p70s6K zu überprüfen.

4.4.1. Blotting 293T

Hier ausgewählte Aufnahmen der Röntgenfilme, jeweils mit den Banden der p-p70s6K und den dazugehörigen Aufnahmen der β -Actin-Banden zum Vergleich. Da der p-p70s6K-Antikörper auch hohe Affinität zu der Isoform des Enzyms, p-p85s6K, aufweist, ist dieses stets mit abgebildet.

Ergebnisse



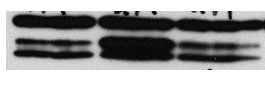



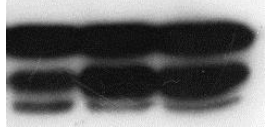

Zellkulturflasche	Banden	0 µg/l E.	2,9 µg/l E.	9,6 µg/l E.
Nunclon	p-p85s6K p-p70s6K			
	β-Actin			
Collagen 1	p-p85s6K p-p70s6K			
	β-Actin			
Unbehandelt	p-p85s6K p-p70s6K			
	β-Actin			
Duranglas	p-p85s6K p-p70s6K			
	β-Actin			

(n= 2 - 7)

Ergebnisse

4.4.2. Blotting VSMC


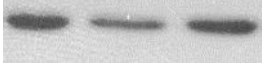
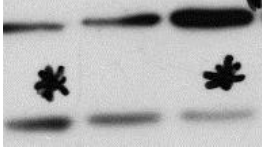

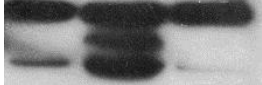



Hier ausgewählte Aufnahmen der Röntgenfilme, jeweils mit den Banden der p-p70s6K und den dazugehörigen Aufnahmen der β -Actin-Banden zum Vergleich, auch hier mit p-p85s6K.

Zellkulturflasche	Banden	0 $\mu\text{g/l}$ E.	2,9 $\mu\text{g/l}$ E.	9,6 $\mu\text{g/l}$ E.
Nuncion	p-p85s6K p-p70s6K			
	β -Actin			
Collagen 1	p-p85s6K p-p70s6K			
	β -Actin			
Unbehandelt	p-p85s6K p-p70s6K			
	β -Actin			
Duranglas	p-p85s6K p-p70s6K			
	β -Actin			

(n= 1 - 2)

4.4.3. Blotting HUVEC

Hier ausgewählte Aufnahmen der Röntgenfilme, jeweils mit den Banden der p-p70s6K und den dazugehörigen Aufnahmen der β -Actin-Banden zum Vergleich, auch hier mit p-p85s6K.

Zellkulturflasche	Banden	0 $\mu\text{g/l}$ E.	2,9 $\mu\text{g/l}$ E.	9,6 $\mu\text{g/l}$ E.
Nunclon	p-p85s6K p-p70s6K			
	β -Actin			
Collagen 1	p-p85s6K p-p70s6K			
	β -Actin			
Unbehandelt	p-p85s6K p-p70s6K			
	β -Actin			
Duranglas	p-p85s6K p-p70s6K			
	β -Actin			

(n= 1 - 3)

4.5. ELISA bei HUVEC

Der ELISA stellt eine sehr sensitive Methode dar, um die Expression bestimmter Proteine in Zelllysaten nachzuweisen. Hier wurden an HUVEC-Zellen jeweils VEGF- und p-p70s6K-ELISAs durchgeführt.

4.5.1. p-p70s6K-ELISA

Die Ergebnisse der p-p70s6K-ELISAs werden in dieser Tabelle und Graphik verdeutlicht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte auch hier auf Duranglas und Nunclon, aufgrund geringer Versuchszahlen werden sie jedoch zusammengefasst. Die Anzahl der Einzelversuche beträgt hier 5 – 6.

Zellkulturflasche	Konzentration p-p70s6K in Units/ml bei 0 µg/l Everolimus (±Standardabweichung)	Konzentration p-p70s6K in Units/ml bei 2,9 µg/l Everolimus (±Standardabweichung)	Konzentration p-p70s6K in Units/ml bei 9,6 µg/l Everolimus (±Standardabweichung)
Nunclon und Duranglas	27,89 (±4,73)	24,12 (±7,97)	15,26 (±6,77)

Ergebnisse

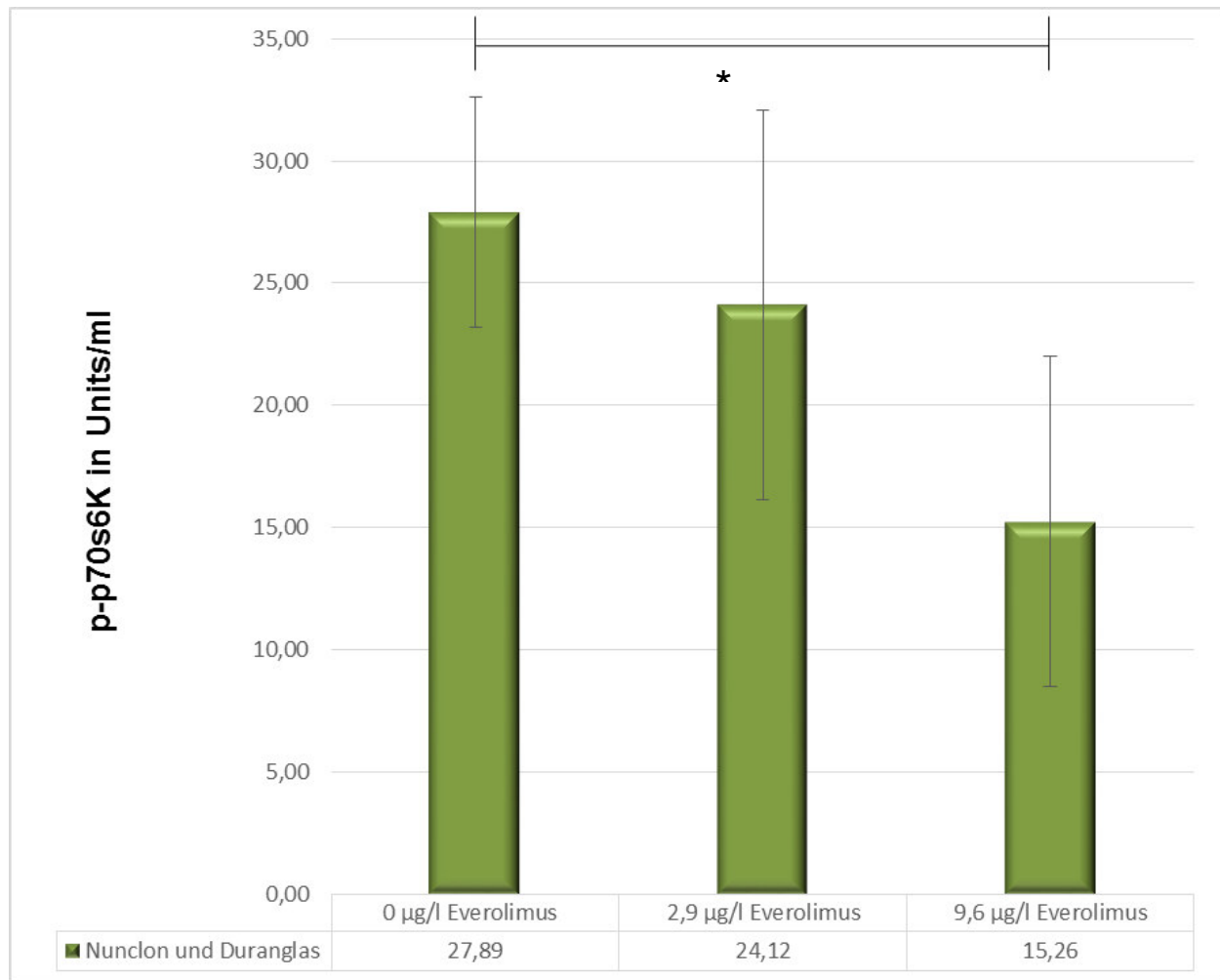


Abbildung 17: Expression p-p70s6K im ELISA nach 48-stündigem Wachstum in zwei verschiedenen Zellkulturflächen, die mit 0/ 2,9 und 9,6 µg/l Everolimus beschichtet wurden. Mit Standardabweichungen (n= 5 - 6). *p < 0,05.

4.5.2. VEGF-ELISA

VEGF als Wachstumsfaktor für Endothelzellen sollte eine wichtige Rolle im Wachstum von HUVEC-Zellen spielen. Deshalb wurden zusätzlich zu den Wachstumsversuchen mit den Proteinlysaten aus zwei bestimmten Zellkulturfラスchen – Nunclon und Duranglas – VEGF-ELISAs durchgeführt, um dessen Expression zu überprüfen.

Hier die Ergebnisse, verdeutlicht in einer Tabelle und Graphik.

Zellkulturfラスche	Konzentration VEGF in pg/ml bei 0 µg/l Everolimus (±Standardab- weichung)	Konzentration VEGF in pg/ml bei 2,9 µg/l Everolimus (±Standardab- weichung)	Konzentration VEGF in pg/ml bei 9,6 µg/l Everolimus (±Standardab- weichung)
Nunclon	81,63 (±38,82)	1374,54 (±32,46)	1090,06 (±399,60)
Duranglas	39,36 (±10,65)	1248,85 (±44,44)	1496,25 (±241,86)

Ergebnisse

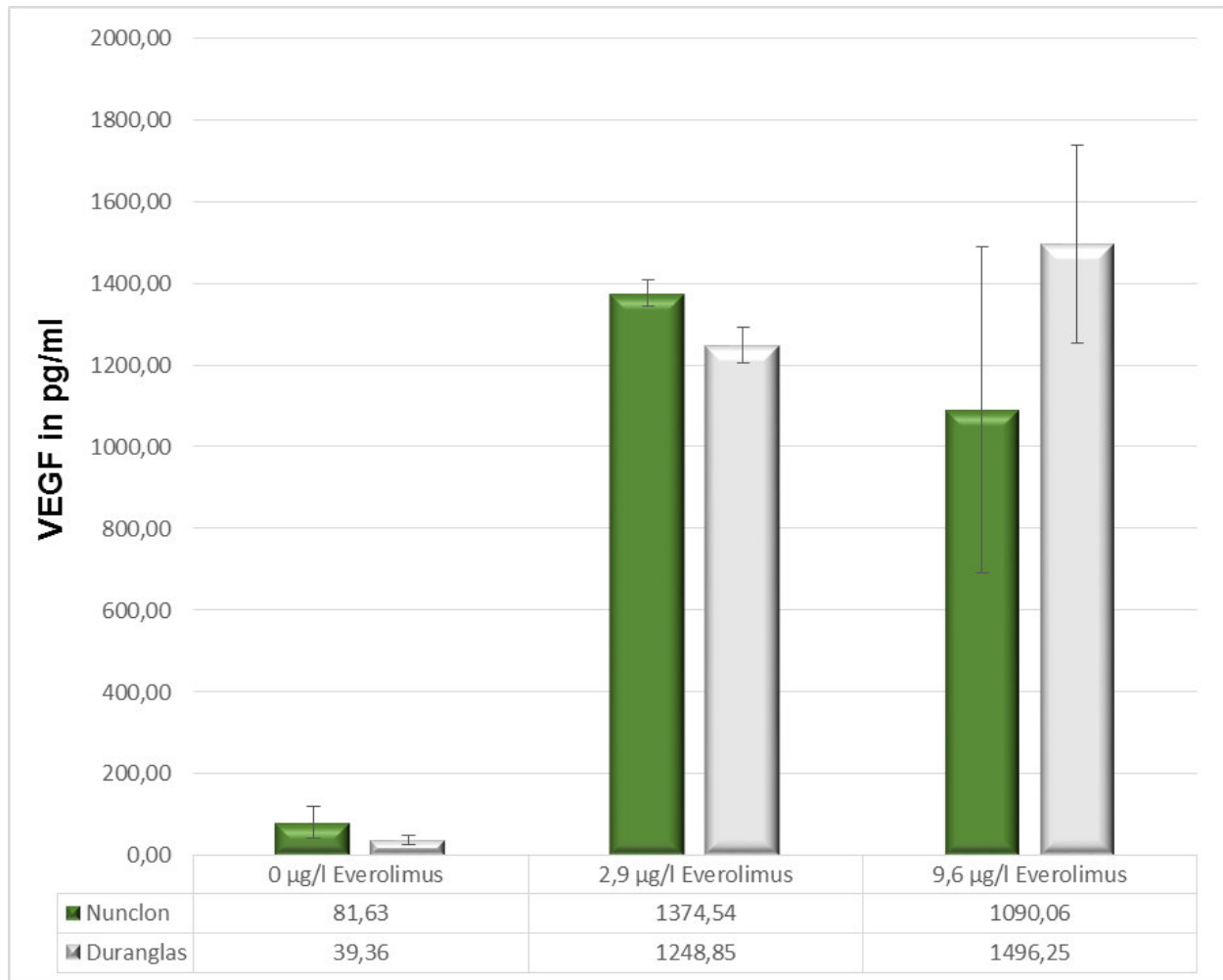


Abbildung 18: Expression VEGF im ELISA nach 48-stündigem Wachstum in zwei verschiedenen Zellkulturflächen, die mit 0/ 2,9 und 9,6 µg/l Everolimus beschichtet wurden. Mit Standardabweichungen (n= 3 – 6).

5. Diskussion

5.1. Everolimuslöslichkeit korreliert mit der Proteinkonzentration

Everolimus ist ein lipophiler Wirkstoff. So spricht die Verschreibungsinformation von „Afinitor“, dem Everolimusprodukt von Novartis, von einer Proteinbindung von circa 74% bei ihren Testpersonen [94].

Folglich ist es eine logische Annahme, dass bei erhöhter Proteinkonzentration die Everolimuslöslichkeit ansteigen sollte. Parallelen zu Studien mit einem anderen stark lipophilen Medikament wurden gezogen: Taxol, ein Zytostatikum aus der Gruppe der Mitosehemmer. Hier zeigten Song et al. 1995 die Stabilisierung der Substanz in Lösung durch FCS. Diese Beobachtung bestätigte sich in unserem Versuch: mit steigendem FCS-Anteil an der Gesamtlösung nahm die Everolimus-Wiederfindungsrate kontinuierlich zu, um bei 70% ein Plateau zu erreichen. Auch bei Song et al. war die Taxolbindung durch Proteine sättigbar, dies könnte eine Erklärung für die Plateaubildung sein (vergleiche [95]).

Nun scheint die endlose Erhöhung des FCS-Anteils am Medium in Zellkulturen zum Zwecke der Löslichkeitserhöhung von Everolimus nicht umsetzbar zu sein. Bereits 1979 zeigte Ryan, dass Zellen von Küken am längsten in Medien mit 5 – 30% FCS überlebten [96]. In den Studien der Arbeitsgruppe Sohi et al. im Jahr 1970 mit Insektenzellen waren die optimalen FCS-Konzentrationen zwar zellspezifisch unterschiedlich, lagen jedoch stets unter 20% [97], ebenso in den Versuchen an Katzenwelszellen durch Cyrino et al. 1998 [98]. So wird heute meist eine FCS-Konzentration von 5 – 20% bevorzugt.

Ein Problem bei unserem Studiendesign ist die geringe Zahl an Einzelversuchen (n=1). Um eine detaillierte Aussage über die Abhängigkeit der Everolimuslöslichkeit von der FCS-Konzentration treffen zu können, wären sicher weitere Versuche notwendig.

5.2. Adsorption an Oberflächen

Offensichtlich adsorbiert Everolimus an die Oberflächen der Zellkulturflaschen. Abhängig ist diese Adsorption neben dem Proteingehalt der Lösung vom Material der Zellkulturflaschen. Nun ist eine derartige Adsorption nicht ungewöhnlich. Es sollen einige Beispiele erläutert werden, die Anzahl an Studien zu diesem Thema ist groß.

Martens et al. untersuchten 1990 die Adsorption von ISDN, Diazepam, Nitroglycerin, Warfarin und weiterer Medikamente an Glasflaschen und PVC-Beutel. 23 - 55% der hier genannten Substanzen banden an die Oberflächen der PVC-Beutel, nicht jedoch an die der Glasflaschen [99]. Auch Illum et al. machten bereits 1982 dieselbe Beobachtung [100]. Hier die nächste Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen unserer Forschungsgruppe: Glas nimmt im Gegensatz zu Kunststoffoberflächen vergleichsweise wenig der Substanz Everolimus auf. Dies trifft auch auf Taxol zu [95].

Die Forschungsgruppe um Palmgrén zeigte 2006, dass neben Benzodiazepinen (diesmal Midazolam und Diazepam) auch Medikamente wie β -Blocker und Imidazole an Polystyrol-Oberflächen binden. Diese Adsorption kann jedoch durch Erhöhung der Medikamentendosis verringert werden, möglicherweise aufgrund einer Substanzsättigung. Ferner binden saure Medikamente wie Thiazide und Naproxen insgesamt sehr viel weniger an Oberflächen als basische, durch Zugabe von Puffer bei letzteren wird die Adsorption jedoch fast vollständig unterbunden (vergleiche [101]). Eventuell wäre auch dies für Adsorptionsexperimente mit Rapamycin ein denkbarer Vorstoß.

Einen anderen Ansatz verfolgten Kambia et al. 2005: Substanzen wie Diazepam und Nitroglycerin, die zuvor ihre Affinität zu PVC-Oberflächen gezeigt hatten (vergleiche [99]), wurden versuchsweise in polypropylenbeschichteten Multilayer- Beuteln gelagert. Diese werden zur Lagerung proteinhaltiger Flüssigkeiten wie künstliche Ernährung hergestellt. Hier zeigte sich kaum Oberflächenadsorption [102]. Bei Noh et al. sank die Adsorption von Diazepam in Multilayer- Beuteln sogar um 89 Prozent im Vergleich zu jener in PVC-Beuteln [103]. Aus Polypropylen bestehen im Bereich der Labortechnik beispielsweise Zentrifugenröhrchen, low-binding-Pipettenspitzen und Schüttelflaschen, interessant wären Zellkulturflaschen aus diesem Material.

5.3. Zellversuche mit Adsorption

Bei allen drei Zellreihen zeigt sich eine signifikante Abnahme des Zellwachstums durch Adsorption von Everolimus an die Oberflächen von Zellkulturflaschen, ohne dass Everolimus direkt zur Lösung gegeben worden wäre. Denkbar wäre als Grund für diesen Zusammenhang die erneute Lösung des Everolimus im Medium und Aufnahme durch die Zellen.

Bei Everolimus-Eluting-Stents sind in den ersten Stunden nach Einsetzen die Everolimusspiegel im Blut deutlich erhöht und erreichen laut der Studie von Lammer et al. zwischen 6,8 und 35 Stunden ihre maximale Konzentration [104]. Wiemer et al. zeigten im Jahr 2008 an einem Patientenkollektiv von 39, dass bei allen Patienten bis auf einen die Everolimuskonzentration im Blut nach Stenting innerhalb von 30 Tagen unter die Nachweisgrenze gesunken war [105]. Auch bei Sheiban et al. setzte der untersuchte EES maximal vier Monate lang Everolimus in die Blutbahn frei, 75% der Emission erfolgte jedoch bereits im ersten Monat [20].

Die Ablösung von Everolimus von der Oberfläche der EES und Freisetzung in den Blutkreislauf sind nicht gewünscht, Ziel des Medikaments sind die unter dem Stentgraft liegenden Endothelzellen. Dieser pharmakodynamische Effekt steht im Verdacht, Ursache für gehäufte Todesfälle nach EES-Implantation zu sein (vergleiche [105]).

Zusätzliche Untersuchungen der Medium-Everolimuskonzentration nach Beschichtung könnten Aufschluss über die Pharmakodynamik geben. Möglicherweise nehmen die Zellen das Everolimus jedoch auch direkt von den beschichteten Oberflächen auf.

5.4. Die Expression der p-p70s6K

5.4.1. p-p70s6K-Western Blot

Die Grundannahme der Expressionsversuche mit den Zelllysaten ist einfach: Zellen, die auf Materialien wie Duranglas gewachsen sind, welches vergleichsweise wenig Everolimus adsorbiert, sollten eine höhere Expression der p-p70s6K aufweisen als Zellen von anderen Materialien wie Nunclon, unbehandeltem Polystyren und Polystyren mit Collagen 1. Als Positivkontrolle wurde hier β -Actin gewählt, verwertbar sind also nur Blots mit gleichbleibend starker Präsenz dieses Proteins. So nimmt die Aktivität der p-p70s6K mit steigender Everolimuskonzentration meist sichtbar ab, vor allem bei den stark proliferierenden Fibroblastenzellen 293, innerhalb der Zellkulturflaschen ist jedoch kein signifikanter dosisabhängiger Unterschied in der Expression zu erkennen.

Western Blot als eher semiquantitative Methode zur Bestimmung einer Proteinexpression heran zuziehen, ist schwierig. Viele Faktoren beeinflussen den Erfolg eines Western Blots: schon unregelmäßige Beschaffenheit des Gels bei der Gelelektrophorese kann die Banden verändern. Beim Blotting selbst werden Proteine größer 60 kDa (wie die p-p70s6K) weniger effizient auf die Membranen übertragen als kleinere. Des Weiteren verändert Methanol auf den Membranen die Porengröße des

aufgebrachten Gels und vermindert teilweise den Proteintransfer. Die große Dauer der Prozedur mit der Anwendung verschiedenster, größtenteils selbst hergestellter Lösungen ist ein weiterer Grund für uneinheitliche Versuchsergebnisse (vergleiche [106]).

Eine Möglichkeit zur Messung der Bandengröße stellt das Computerprogramm „ImageJ“ dar, welches die Fläche berechnet und vergleicht. Auch hier gibt es jedoch Anwendungsschwierigkeiten: die Größe der Bande legt der Benutzer selbst fest, die Helligkeit der eingescannten Blots und kleinere Unebenheiten in den Banden sind oft schwer mit einzuberechnen (vergleiche [107]).

Auch kleine Fallzahlen von teilweise $n=1$ sind hier limitierend für die Aussagekraft. Ob also die Unterschiede zwischen den Zellkulturflaschen zu klein sind, um sie in einem optischen Medium wie dem Western Blot darzustellen, oder ob keine existieren, bleibt unklar.

Möglicherweise sind auch die Unterschiede in der Everolimusdosis zu gering: die Forschungsgruppe Chiong et al. zeigte 2011 bei Blasenkrebszellen stark abnehmende p-p70s6K-Expression im Western Blot, ausgelöst durch Everolimus (RAD001)-Exposition. Die Konzentrationen des Medikaments unterschieden sich jedoch untereinander um den Faktor 10 bis 20 [108]. In unserem Versuch differieren die Konzentrationen in der Beschichtungslösung circa um den Faktor 3,3, die adsorbierte Menge der Substanz liegt noch darunter.

5.4.2. p-p70s6K-ELISA

Wie bereits unter Punkt 1.2.7. beschrieben, stellt die p-p70s6K ein Phosphorylierungsprodukt von TORC1 dar. Bei Hemmung des Komplexes mittels Rapamycin- Everolimus sollte die Expression der Kinase abnehmen. Erwartungsgemäß konnte dies im ELISA gezeigt werden.

5.5. Die Expression von VEGF in HUVEC

Offensichtlich nahm die Aktivität von VEGF in dem hier gewählten Versuchsaufbau mit steigender Everolimuskonzentration nicht ab, sondern im Gegenteil sogar zu, und das, obwohl die wachstumshemmende Wirkung der Everolimusbeschichtung bei Nunclon und Duranglas anhand des Zellwachstums deutlich gezeigt worden war. Es musste also einen anderen, von Rapamycin nicht beeinflussten Weg der Aktivierung in Endothelzellen geben.

Dies bestätigen auch Forschungsgruppen wie Brugarolas et al. Sie untersuchten im Jahr 2003 Mäuse mit TSC-Knockout. Bei diesen Versuchstieren war die Expression von VEGF deutlich erhöht, was der Aktivierung des mTOR-abhängigen pathways entsprechen würde. Dem gegenüber standen jedoch Ergebnisse, die verdeutlichten, dass mit Rapamycin bei diesen Individuen nur eine teilweise Herunterregulierung von VEGF erreicht werden konnte [109].

Eine im Jahr 2013 durchgeführte Studie von Zhuang et al. deckte nun weitere, an der VEGF-Aktivierung beteiligte Proteine auf: TORC2, zusammen mit PI3K, soll VEGF-abhängige Phosphorylierung kontrollieren. Zudem spielt es eine zentrale Rolle bei der Regulierung der FOX-Proteine, deren Expression bei steigender TORC2-Aktivität gehemmt wurde und die Zellen (HUVEC) weniger sensibel für mTOR-Inhibitoren machte [110].

TORC2 kann den Komplex Rapamycin-FKBP12 nicht binden [28], dies ist also ein Erklärungsansatz für die durch Rapamycin nicht beeinflussbare VEGF-Expression in unserem Versuch. Welche anderen Mechanismen am VEGF-pathway beteiligt sind, bleibt Stoff für zukünftige Forschung.

Zudem ist die Anzahl an Einzelversuchen teilweise zu gering (3 - 6), um eine konkrete Aussage über die Veränderung der VEGF-Aktivität zu treffen. Nur ein Trend ist hier abzulesen.

5.6. Ausblick

Insgesamt kann man also davon ausgehen, dass Everolimus in erheblichem Maße an die Oberflächen von gängigen Zellkulturflaschen adsorbiert. Ein jedoch noch erheblich größerer Teil des in Lösung gegebenen Everolimus ist nach einer Stunde gar nicht mehr nachweisbar. Von vielen Medikamenten ist der Zerfall unter UV- Licht bekannt und das lichtgeschützte Lagern empfohlen, auch bei Everolimus ist dies der Fall. Der Anwender der Everolimusprodukte Afinitor® und Certican® wird in der Arzneimittelinformation explizit daraufhin gewiesen, die Medikamente in der Originalverpackung aufzubewahren, um sie vor UV- Licht und damit einer Minderung der Arzneimittelwirkung zu schützen. Everolimus wurde in unserer Arbeitsgruppe in einem von Aluminiumfolie ummantelten Gefäß im Gefrierschrank gelagert, das sterile Verdünnen und das abschließende Probenentnehmen musste jedoch aus

nachvollziehbaren Gründen in einem Raum mit zumindest kleiner Lichtquelle stattfinden. Inwieweit das zu dem Zerfall von Everolimus beigetragen hat, ist unklar.

Auch ein zu warmes Lagern kann Arzneimittelwirkung mindern, jedoch war die Zeit zwischen Auftauen des Medikamentes und dessen Einsatz kurz gehalten [94, 111].

Sicher ist ein Teil des „Everolimusverlustes“ auch auf minimale menschliche Fehler bei der Dosierung des Medikamentes zurück zu führen.

Die Veröffentlichungen zum Thema Versuchsreihen mit mTOR- Inhibitoren wie Everolimus und Sirolimus in vitro sind zahlreich (beispielhaft [112-114]). Selbstverständlich wird die exakte zugegebene Menge/ Konzentration des Medikaments jeweils angegeben. Die Versuchsreihen laufen teilweise über mehrere Tage. Nachmessen der Arzneimittelkonzentration in Lösung sucht man in den Veröffentlichungen jedoch vergeblich. Insofern kann man, den Ergebnissen unserer Forschungsgruppe nach zu urteilen, davon ausgehen, dass die tatsächlichen Arzneimittelkonzentrationen der mTOR- Inhibitoren in den Lösungen weit unter den angegebenen liegen.

6. Zusammenfassung

mTOR-Inhibitoren (Synonym: Rapamycin) sind Wirkstoffe, die sowohl in der Immunsuppression als auch in der antiproliferativen Therapie systemisch und lokal Verwendung finden.

In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe mit Zellkulturen zeigte sich schnell ein großes Adsorptionspotential von Rapamycin – beziehungsweise von dessen Derivat Everolimus – an die Oberflächen von Zellkulturflaschen. Diese Adsorption hängt im Wesentlichen von zwei Faktoren ab: dem Proteingehalt des Mediums und der spezifischen Oberfläche der Zellkulturflaschen.

Um dies zu zeigen, wurden verschiedene gebräuchliche Zellkulturflaschen (Nunclon, Ultra-low-attachment, Weichglas, unbehandelte Polystyren-Oberflächen und Polystyren-Oberflächen beschichtet mit Collagen 1 beziehungsweise Poly-D-Lysin) sowie Duranglas-Petrischalen ausgewählt. Die Oberflächen der Zellkulturflaschen wurden eine Stunde mit Medium mit einer definierten Menge an Everolimus bedeckt, gespült und wiederum eine Stunde mit DMSO bedeckt. DMSO löst die Substanz wieder von der Oberfläche ab. Die Everolimuskonzentrationen im Medium nach einer Stunde und in der DMSO-Lösung wurden mittels LC-MS/MS bestimmt.

Es zeigte sich signifikante Adsorption von Everolimus in absteigender Reihenfolge: Ultra-low-attachment > Unbehandeltes Polystyren > Collagen 1 > Nunclon > Poly-D-Lysin > Weichglas > Duranglas (bei 10% FCS in Medium) und Ultra-low-attachment > Unbehandelt > Collagen 1 > Weichglas > Poly-D-Lysin > Duranglas (bei 30% FCS in Medium).

Im Folgeversuch wurden vier der Zellkulturflaschen ausgewählt (Nunclon, Unbehandelt, Collagen 1, Duranglas-Petrischalen) und untersucht, ob die reine Adsorption von Everolimus an die Oberfläche ohne Everolimus im Medium negative Effekte auf das Zellwachstum hat. Dies konnte bei drei Zelllinien (293T, VSMC, HUVEC) mittels Zellzählung demonstriert werden.

Bei allen drei Zelllinien wurden p-p70s6K- Western Blots durchgeführt. Die p-p70s6K ist ein downstream gelegenes Phosphorylierungsprodukt von mTOR, welches wiederum von Rapamycin/ Everolimus gehemmt wird. Teilweise zeigte sich hier eine absteigende Phosphorylierung.

Zusammenfassung

Bei HUVEC- Zellen wurde zusätzlich die Expression von VEGF und p-p70s6K mittels ELISA untersucht. VEGF ist ein Faktor, der Wachstumssignale spezifisch an Gefäß-Endothelzellen vermittelt. Hier konnte entgegen der Erwartungen sogar eine Zunahme der Expression mit steigender Everolimuskonzentration gemessen werden. Neuere Studien legen jedoch nahe, dass VEGF nicht ausschließlich über TOR aktiviert wird. Bei p-p70s6K zeigte sich die erwartete Abnahme der Expression.

Die Versuche weisen auf eine signifikante Beeinflussung des Zellwachstums durch Everolimusadsorption an Oberflächen hin. Inwiefern sich Adsorption bei Zellversuchen mit Everolimus in Lösung auswirkt, ist noch unklar. Eine Minderung der Everolimuswirkung wäre denkbar.

Um die Oberflächenadsorption bei Versuchen mit Everolimus möglichst gering zu halten, empfiehlt unsere Arbeitsgruppe anhand der Versuchsergebnisse die Kultivierung auf wenig absorbierenden Oberflächen wie Duranglas beziehungsweise die Erhöhung der FCS-Konzentration in Lösung, soweit von den Zellen toleriert.

7. Abkürzungen

(m)TOR(C1/2)	(mammalian) target of Rapamycin (Complex 1/2)
(p-)p70s6K	(Phospho-) 70 kDa ribosomal protein S6 kinase
4E-BP1	eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1
AVO 1-3	adheres-voraciously-to-target-of-rapamycin-2 proteins 1-3
BMS	Bare-Metal-Stent
BSA	Bovine Serum Albumin
DES	Drug-Eluting-Stent
EES	Everolimus-Eluting-Stent
eIF4A/B	eukaryotic initiation factor 4A/B
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	extracellular-signal-regulated kinase 1/2
FCS	fetal calf serum
FKBP12	FK506 binding protein 12
FOX	Forkhead-Box-Protein
FRB	FKB12-Rapamycin-bindenden Domäne
HRP	Horseradish- Peroxidase
IRS1	Insulin receptor substrate 1
ISDN	Isosorbiddinitrat
KOG1	Kontroller Of Growth 1
LC- MS/ MS	Liquid-Chromatographie - Massenspektometrie/ Massenspektometrie
LST8	lethal with SEC13 protein 8
PBMC	peripheral blood mononuclear cell

Abkürzungen

PDCD4	Programmed cell death 4
PI3K	Phosphatidyl-Inositid-3OH-Kinase
PRAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PVC	Polyvinylchlorid
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	rapamycin- insensitive companion of mTOR
SREBP1	sterol regulatory element binding protein 1
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wnt	Zusammengesetzt aus Wingless und Int-1

8. Appendix- Gele gießen

Die Gele zur Probenaufnahme wurden bei unseren Versuchsreihen selbst hergestellt. Zuerst wurde das Laufgel gegossen. Für zwei Gele bereitete man folgende Lösung vor:

Reagenz	Menge in Milliliter
Aqua destillata	6,0
30% Acrylamide mix	5,0
1,5M Tris (pH 8,8; 4°C)	3,8
20% SDS	0,075
TEMED	0,006
APS	0,15

Wichtig war hier, TEMED und APS am Ende und in dieser Reihenfolge zuzugeben, da das Gel dann bald begann, zu polymerisieren.

Pro Gelkammer wurden ca. 3,5 Milliliter der Lösung eingipettiert und dann von ca. 1 Milliliter Isopropanol überschichtet, um die Oberfläche des Gels gleichmäßig zu gestalten. Nach ca. einer halben Stunde war das Laufgel polymerisiert. Das Isopropanol wurde abdekantiert, die Oberfläche des Gels zwei- bis dreimal mit Aqua destillata gespült und mit normalem Filterpapier getrocknet.

Anschließend wurde das Sammelgel wie folgt gegossen. Diese Lösung war wiederum für zwei Gele geeignet:

Reagenz	Menge in Milliliter
Aqua destillata	2,9
30% Acrylamide mix	0,67
1,5M Tris (pH 8,8; 4°C)	0,35
20% SDS	0,02
TEMED	0,004
APS	0,04
Bromphenolblau, fest	1 Krümel

Von dieser Lösung wurden nacheinander mehrere Milliliter in die Gelkammer pipettiert, bis die Flüssigkeit am oberen Rand anstand. Nun wurden die beiden 10er-Kämme oben

Appendix

in die Gelkammern ganz eingesteckt, sodass die Flüssigkeit leicht überlief. Auf diese Weise wurden Blasen im Gel verhindert. Nach einer weiteren halben Stunde war das Gel fest. Je nach Bedarf konnte das Gel nun gleich verwendet werden oder innerhalb der Gelkammer in einem feuchten, nicht fasernden Tuch in einer Plastiktüte bis zu vier Wochen bei 4 – 8°C aufbewahrt werden.

9. Literaturverzeichnis

1. Loewith, R. and M.N. Hall, *Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control*. Genetics, 2011. **189**(4): p. 1177-201.
2. Vezina, C., A. Kudelski, and S.N. Sehgal, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle*. J Antibiot (Tokyo), 1975. **28**(10): p. 721-6.
3. Sehgal, S.N., *Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action*. Transplant Proc, 2003. **35**(3 Suppl): p. 7S-14S.
4. Swindells, D.C.N., P.S. White, and J.A. Findlay, *THE X-ray crystal structure of rapamycin, C₅₁H₇₉NO₁₃*. Canadian Journal of Chemistry, 1978(56): p. 2491-2492.
5. Martel, R.R., J. Klicius, and S. Galet, *Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic*. 1977. **55**: p. 48-51.
6. Kay, J.E., et al., *Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin*. Immunology, 1991. **72**(4): p. 544-9.
7. Kino, T., et al., *FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro*. J Antibiot (Tokyo), 1987. **40**(9): p. 1256-65.
8. Sehgal, S.N., et al., *Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide*. Med Res Rev, 1994. **14**(1): p. 1-22.
9. Kahan, B.D., et al., *Multi-center Phase II Trials of Sirolimus (SRL) in Renal Transplantation: six-month results* Abstracts of XVI International Congress of the Transplantation Society, 1996. **Abstract #86**: p. 75.
10. Rohde, J., J. Heitman, and M.E. Cardenas, *The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 9583-6.
11. Kurian, K.C. and A. Addisu, *Sirolimus: a novel immunosuppressive drug in heart transplantation*. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2009. **4**(3): p. 187-91.
12. Eng, C.P., S.N. Sehgal, and C. Vezina, *Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors*. J Antibiot (Tokyo), 1984. **37**(10): p. 1231-7.
13. Atkins, M.B., et al., *Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2004. **22**(5): p. 909-18.

14. Motzer, R.J., et al., *Phase I/II trial of temsirolimus combined with interferon alfa for advanced renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(25): p. 3958-64.
15. Chan, S., et al., *Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(23): p. 5314-22.
16. Bollard, J., et al., *Antitumor effect of everolimus in preclinical models of high-grade gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas*. Neuroendocrinology, 2013. **97**(4): p. 331-40.
17. Dinh, T.Q., R.J. Tuch, and R.S. Schwartz, *Drug eluting stent*. 1995, Medtronic, Inc. : USA. p. 9-10.
18. Bangalore, S., et al., *Bare metal stents, durable polymer drug eluting stents, and biodegradable polymer drug eluting stents for coronary artery disease: mixed treatment comparison meta-analysis*. BMJ, 2013. **347**: p. f6625.
19. Abbott Vascular, U. *XIENCE Xpedition™, XIENCE Xpedition SV, and XIENCE Xpedition LL, Everolimus Eluting Coronary Stent Systems, Instructions for Use* 2012. 92.
20. Sheiban, I., et al., *Next-generation drug-eluting stents in coronary artery disease: focus on everolimus-eluting stent (Xience V)*. Vasc Health Risk Manag, 2008. **4**(1): p. 31-8.
21. Sabate, M., et al., *The EXAMINATION (Everolimus-Eluting Stents Versus Bare-Metal Stents in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) Trial: 2-Year Results From a Multicenter Randomized Controlled Trial*. JACC Cardiovasc Interv, 2013.
22. Nikolsky, E., et al., *SPIRIT IV trial design: a large-scale randomized comparison of everolimus-eluting stents and paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease*. Am Heart J, 2009. **158**(4): p. 520-526 e2.
23. Hoeffer, C.A., et al., *Removal of FKBP12 enhances mTOR-Raptor interactions, LTP, memory, and perseverative/repetitive behavior*. Neuron, 2008. **60**(5): p. 832-45.
24. Vilella-Bach, M., et al., *The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression*. J Biol Chem, 1999. **274**(7): p. 4266-72.

25. Cryan, J., et al., *FKBP, the binding protein for the immunosuppressive drug, FK-506, is not an inhibitor of protein kinase C activity*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **180**(2): p. 846-52.
26. Cafferkey, R., et al., *Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6012-23.
27. Helliwell, S.B., et al., *TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast*. Mol Biol Cell, 1994. **5**(1): p. 105-18.
28. Loewith, R., et al., *Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control*. Mol Cell, 2002. **10**(3): p. 457-68.
29. Shiota, C., et al., *Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability*. Dev Cell, 2006. **11**(4): p. 583-9.
30. Laplante, M. and D. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. Journal of Cell Science, 2009. **122**: p. 3589-3594.
31. Jacinto, E., et al., *Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1122-8.
32. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
33. Yip, C.K., et al., *Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition*. Mol Cell, 2010. **38**(5): p. 768-74.
34. Long, X., et al., *Rheb binds and regulates the mTOR kinase*. Curr Biol, 2005. **15**(8): p. 702-13.
35. Inoki, K., et al., *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 648-57.
36. Harrington, L.S., G.M. Findlay, and R.F. Lamb, *Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(1): p. 35-42.
37. Ma, L., et al., *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis*. Cell, 2005. **121**(2): p. 179-93.

38. Roux, P.P., et al., *Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13489-94.
39. Lee, D.F., et al., *IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway*. Cell, 2007. **130**(3): p. 440-55.
40. Kim, J. and K.L. Guan, *Amino acid signaling in TOR activation*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 1001-32.
41. Foster, D.A., *Regulation of mTOR by phosphatidic acid?* Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 1-4.
42. Kuranda, K., et al., *Investigating the caffeine effects in the yeast Saccharomyces cerevisiae brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways*. Mol Microbiol, 2006. **61**(5): p. 1147-66.
43. Shamji, A.F., F.G. Kuruvilla, and S.L. Schreiber, *Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins*. Curr Biol, 2000. **10**(24): p. 1574-81.
44. Wouters, B.G. and M. Koritzinsky, *Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(11): p. 851-64.
45. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival*. Cell, 2003. **115**(5): p. 577-90.
46. Feng, Z., et al., *The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8204-9.
47. Barbet, N.C., et al., *TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(1): p. 25-42.
48. Beretta, L., et al., *Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation*. EMBO J, 1996. **15**(3): p. 658-64.
49. *mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Cancer Therapy*, V.A. Polunovsky and P.J. Houghton, Editors. 2010, Springer. p. 15-18(316).
50. Chen, C., et al., *TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2397-408.
51. Schieke, S.M., et al., *The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity*. J Biol Chem, 2006. **281**(37): p. 27643-52.

52. Guntur, K.V., et al., *Map4k4 negatively regulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma protein translation by suppressing the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in cultured adipocytes*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6595-603.
53. Porstmann, T., et al., *SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth*. Cell Metab, 2008. **8**(3): p. 224-36.
54. Gurnell, M., *PPAR Gamma and Metabolism: Insights From the Study of Human Genetic Variants*. Clinical Endocrinology, 2003. **59**(3).
55. Chung, J., et al., *Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases*. Cell, 1992. **69**(7): p. 1227-36.
56. Kozma, S.C. and G. Thomas, *p70s6k/p85s6k: mechanism of activation and role in mitogenesis*. Semin Cancer Biol, 1994. **5**(4): p. 255-60.
57. Brown, E.J., et al., *Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo*. Nature, 1995. **377**(6548): p. 441-6.
58. Mukhopadhyay, N.K., et al., *An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase*. J Biol Chem, 1992. **267**(5): p. 3325-35.
59. Pullen, N., et al., *Phosphorylation and Activation of p70s6k by PDK1*. Science, 1998. **279**: p. 707-710.
60. Miyakawa, M., et al., *Increased expression of phosphorylated p70S6 kinase and Akt in papillary thyroid cancer tissues*. Endocr J, 2003. **50**(1): p. 77-83.
61. Ming, X.F., et al., *Activation of p70/p85 S6 kinase by a pathway independent of p21ras*. Nature, 1994. **371**(6496): p. 426-9.
62. Hara, K., et al., *1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(16): p. 7415-9.
63. Hara, K., et al., *Normal activation of p70 S6 kinase by insulin in cells overexpressing dominant negative 85kD subunit of phosphoinositide 3-kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **208**(2): p. 735-41.
64. Jefferies, H.B. and G. Thomas, *Ribosomal Protein S6 Phosphorylation and Signal Transduction*, in *Translational Control*. 1996, Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 389-409.

65. Shama, S. and O. Meyuhas, *The translational cis-regulatory element of mammalian ribosomal protein mRNAs is recognized by the plant translational apparatus*. Eur J Biochem, 1996. **236**(2): p. 383-8.
66. Jefferies, H.B., et al., *Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4441-5.
67. Lane, H.A., et al., *p70s6k function is essential for G1 progression*. Nature, 1993. **363**(6425): p. 170-2.
68. Ferrari, S. and G. Thomas, *S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1994. **29**(6): p. 385-413.
69. Montagne, J., et al., *Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size*. Science, 1999. **285**(5436): p. 2126-9.
70. Pende, M., et al., *Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 994-7.
71. Peralba, J.M., et al., *Pharmacodynamic Evaluation of CCI-779, an Inhibitor of mTOR, in Cancer Patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(8): p. 2887-92.
72. Boulay, A., et al., *Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells*. Cancer Res, 2004. **64**(1): p. 252-61.
73. Tabernero, J., et al., *Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors*. J Clin Oncol, 2008. **26**(10): p. 1603-10.
74. Hartmann, B., et al., *Biochemical monitoring of mTOR inhibitor-based immunosuppression following kidney transplantation: a novel approach for tailored immunosuppressive therapy*. Kidney Int, 2005. **68**(6): p. 2593-8.
75. Gospodarowicz, D., J.A. Abraham, and J. Schilling, *Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7311-5.
76. Shweiki, D., et al., *Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis*. J Clin Invest, 1993. **91**(5): p. 2235-43.

77. Jakeman, L.B., et al., *Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis*. Endocrinology, 1993. **133**(2): p. 848-59.
78. Kim, K.J., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 841-4.
79. ANHANG 1 ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS AVASTIN (Bevacizumab). Roche Pharma AG.
80. Lien, S. and H.B. Lowman, *Therapeutic anti-VEGF antibodies*. Handb Exp Pharmacol, 2008(181): p. 131-50.
81. Trinh, X.B., et al., *The VEGF pathway and the AKT/mTOR/p70S6K1 signalling pathway in human epithelial ovarian cancer*. Br J Cancer, 2009. **100**(6): p. 971-8.
82. Abid, M.R., et al., *Vascular endothelial growth factor activates PI3K/Akt/forkhead signaling in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(2): p. 294-300.
83. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. Vol. 2. 2009: Spektrum Akademischer Verlag.
84. *Gebrauchsanweisung Roti-Quant- Proteinbestimmung nach Bradford*. 2013, Carl Roth GmbH + Co. KG
85. *WESTERN BLOTTING - A BEGINNER'S GUIDE* abcam. p. 13.
86. <http://howtowesternblot.net/western-blot-protocol/> [cited 2014 01/17].
87. *Modul 4 - Skript Western Blot*. 2013, Universität Karlsruhe p. 11.
88. Mahmood, T. and P. Yang, *Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting*. North American Journal of Medical Sciences, 2012. **4**(9): p. 429-434.
89. http://www.researchgate.net/post/Minimal_amount_of_cells_protein_for_Western_Blot [cited 2014 01/17].
90. LCI, LC-MS/MS - Was ist das eigentlich? SÜSSWAREN 2002. **9**: p. 2.
91. Streit, F., V.W. Armstrong, and M. Oellerich, *Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporin A in whole blood*. Clin Chem, 2002. **48**(6 Pt 1): p. 955-8.

92. *Invitrogen ELISA Kit *p70-S6K*. 2010, Invitrogen Corporation. p. 32.
93. *Quantikine® ELISA Human VEGF Immunoassay* 2012, R&D Systems, Inc. p. 14.
94. *FULL PRESCRIBING INFORMATION AFINITOR*. 2010, Novartis Pharmaceuticals Corporation. p. 25.
95. Song, D., L.F. Hsu, and J.L. Au, *Binding of taxol to plastic and glass containers and protein under in vitro conditions*. J Pharm Sci, 1996. **85**(1): p. 29-31.
96. Ryan, J.M., *Effect of different fetal bovine serum concentrations on the replicative life span of cultured chick cells*. In Vitro, 1979. **15**(11): p. 895-9.
97. Sohi, S.S. and C. Smith, *Effect of fetal bovine serum on the growth and survival of insect cell cultures*. Can J Zool, 1970. **48**(3): p. 427-32.
98. Cyrino, J.E. and D.R. Mulvaney, *Mitogenic activity of fetal bovine serum, fish fry extract, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor on brown bullhead catfish cells--BB line*. Rev Bras Biol, 1999. **59**(3): p. 517-25.
99. Martens, H.J., P.N. De Goede, and A.C. Van Loenen, *Sorption of various drugs in polyvinyl chloride, glass, and polyethylene-lined infusion containers*. Am J Hosp Pharm, 1990. **47**(2): p. 369-73.
100. Illum, L. and H. Bundgaard, *Sorption of drugs by plastic infusion bags*. International Journal of Pharmaceutics, 1982. **10**(4): p. 339-351.
101. Palmgren, J.J., et al., *Drug adsorption to plastic containers and retention of drugs in cultured cells under in vitro conditions*. Eur J Pharm Biopharm, 2006. **64**(3): p. 369-78.
102. Kambia, N.K., et al., *Compatibility of nitroglycerin, diazepam and chlorpromazine with a new multilayer material for infusion containers*. J Pharm Biomed Anal, 2005. **37**(2): p. 259-64.
103. Noh, D.I., K.N. Park, and H.J. Chun, *Compatibility of Diazepam with Polypropylene Multilayer Infusion Container*. Macromolecular Research, 2009. **17**(7): p. 516-521.
104. Lammer, J., et al., *Pharmacokinetic analysis after implantation of everolimus-eluting self-expanding stents in the peripheral vasculature*. J Vasc Surg, 2012. **55**(2): p. 400-5.
105. Wiemer, M., et al., *Systemic exposure of everolimus after stent implantation: a pharmacokinetic study*. Am Heart J, 2008. **156**(4): p. 751 e1-7.

106. <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/protein-analysis-guide/protein-identification/factors-influencing-western-blot-results.html> [cited 2014 01/20].
107. Kraus, D. *Eine kleine Anleitung zum Auswerten von Western Blots mit ImageJ*. 2006. 3.
108. Chiong, E., et al., *Effects of mTOR inhibitor everolimus (RAD001) on bladder cancer cells*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(9): p. 2863-73.
109. Brugarolas, J.B., et al., *TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways*. Cancer Cell, 2003. **4**(2): p. 147-58.
110. Zhuang, G., et al., *Phosphoproteomic analysis implicates the mTORC2-FoxO1 axis in VEGF signaling and feedback activation of receptor tyrosine kinases*. Sci Signal, 2013. **6**(271): p. ra25.
111. <http://ch.oddb.org/de/gcc/print/reg/56238/seq/01/patinfo/> [cited 2015 08/01].
112. Ishikawa, D., et al., *mTOR inhibitors control the growth of EGFR mutant lung cancer even after acquiring resistance by HGF*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e62104.
113. Masola, V., et al., *Everolimus-induced epithelial to mesenchymal transition in immortalized human renal proximal tubular epithelial cells: key role of heparanase*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 292.
114. Jeruschke, S., et al., *Protective effects of the mTOR inhibitor everolimus on cytoskeletal injury in human podocytes are mediated by RhoA signaling*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55980.

10. Eidesstattliche Versicherung

Schnürer, Susanne

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Adsorptionsverhalten von Everolimus in vitro und Auswirkungen
auf die Zellkultur

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner
weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem
Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche
kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung
der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation
nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle
zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 15.03.2016

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin